

Transkriptionelle Netzwerke der RAS-abhängigen, MEK-ERK-vermittelten Transformation

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Andrea Solf

Präsident/Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan/Dekanin der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/innen:

1. PD Dr. Christine Sers
2. Prof. Dr. Hanspeter Herzel
3. Prof. Dr. Edda Klipp

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2011

Gewidmet Waldtraut Bading und Christa Solf

If the doors of perception were cleansed,
every thing would appear to man as it is, infinite.
For man has closed himself up, till he sees all
things thro' narrow chinks of his cavern

(William Blake)

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Abbildungsverzeichnis	VI
III Tabellenverzeichnis	IX
IV Abkürzungsverzeichnis	XII
V Zusammenfassung	XVII
VI Abstract	XIX
1. Einleitung	1
1.1 Genregulation und Onkogenese	1
1.2 RAS-Netzwerke	2
1.2.1 RAS-Proteine	2
1.2.2 Signalübertragung und RAS-Aktivierung	2
1.2.3 Direkte Effektoren von RAS	3
RAF	3
Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-kinase (PI3K)	4
GEFs der RAL-Proteine	4
Weitere	4
1.3 MAPK Signalwege	5
1.3.1 Allgemeines	5
1.3.2 Module und Signalleitung	6
1.3.3 ERK1 und ERK 2	7
Aktivierungsmechanismen und Lokalisationsregulation	7
Aktivitätsregulation	7
Substrate und Zielmotive	8
1.3.4 JNK	8
1.3.5 P38	9
1.3.5 ERK5	9
1.3.6 Kinasen unterhalb der MAPK	10
1.4 ERK-abhängige transkriptionelle Netzwerke	10
1.4.1 Allgemeines	10
1.4.2 SRF	11

1.4.3 Ternary Complex Factors (TCF)	12
Aktivierungsmechanismus	13
ELK3	14
1.4.4 AP1 Komplex	15
AP1 (Aktivator Protein 1)	15
AP1-Komplex: Untereinheiten und DNA-Bindung	17
Transkriptionelle AP1 -Regulierung	18
Posttranslationale AP1-Regulierung	19
Bekannte AP1 und FRA1- Zielgene	19
2. Problemstellung	20
3. Material und Methoden	22
3.1 Geräte und Material	22
3.1.1 Übersicht Zelllinien und Medien	22
3.1.2 Transfektionsreagenzien, Inhibitoren und siRNAs	22
3.1.3 Antikörper, Blockpeptide, Primer und Taqmanassays	23
3.1.4 Sonstige Chemikalien, Kits und Stammlösungen	26
3.1.5 Software, Geräte und Verbrauchsmaterial	29
3.2 Verwendete Zellen und Zellkultur	30
3.3 MEK/ERK-Signalweghemmung und Hemmung der Zielgene	32
3.3.1 MEK/ERK-Signalweghemmung	32
3.3.2 siRNA-Experimente	32
Prinzip	32
Lipophile Transfektion von Zellen	33
Transfektion mit Oligofektamin	33
Transfektion mit Primefect	33
3.4 Präparationen	33
3.4.1 DNA	33
3.4.2 RNA	34
3.4.3 Proteinextraktion-Gesamtzelllysate	34
3.4.4 Proteinextraktion-Fraktionierung	35
3.4.5 Amidoschwarzmessung der Proteinkonzentration	36

3.5 Analytische Methoden	36
3.5.1 PCR, RT-PCR und Taqman	36
3.5.2 Microarrayanalyse	39
Hybridisierung und Standardisierung	39
Zielgenermittlung mittels P-Werten und Expressionsunterschieden	40
GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)	40
TRAP (Transcription Factor Affinity Prediction)	40
GO Analyse (Gene Ontology)	41
3.5.3 Proteine	41
SDS-PAGE und Westernblot	41
Durchflusszytometrie	42
Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid	43
3.5.4 Protein-DNA Interaktionen	43
ChIP (Chromatinimmunopräzipitation)	43
3.5.5 Wachstumsassays	46
MTT	46
Softagarassay	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Charakterisierung von HA1EB und HA1ER	47
4.1.1 Untersuchung morphologischer Merkmale	47
4.1.2 Zellzyklus und Ploidie	48
4.1.3 Aktivierung der MEK-/ERK-Kaskade	49
4.1.4 Wachstumsassays	50
4.2 MEK/ERK-abhängig gesteuerte Zielgene in HA1EB und HA1ER	51
4.2.1 Microarrayanalyse	52
Datenprozessierung	52
Statistische Analyse	53
GO-Analyse: Transkriptionsassoziierte Zielgene	54
4.2.2 Validierung von ERK-Zielgenen mittels Westernblot und RT-PCR	55
4.3 siRNA- vermittelte Hemmung von RAS-ERK Zielgenen	59
4.3.1 transiente Hemmung der Transkriptionsfaktorexpression	59

Zielgene	59
Experimentelle Strategie	59
Etablierung der Transfektionsbedingungen und Test der SCR-siRNAs	60
Etablierung der siRNA-vermittelten SRF Hemmung	61
Etablierung der siRNA-vermittelten FRA1 Hemmung	63
Etablierung der siRNA-vermittelten ELK3 Hemmung	64
Etablierung der siRNA-vermittelten HMGA1, ATF3 und ETV1-Hemmung	65
4.3.2 ChIP-Etablierung	67
Definition zu optimierender Parameter	67
Formaldehydinkubation	67
Optimierung der DNA-Scherrate	68
Präzipitationsbedingungen	70
Inputmenge	70
4.4 Transkriptionelle Netzwerke von SRF, FRA1 und ELK3	71
4.4.1 Phänotypische Untersuchungen	71
Wachstumsanalyse in 96-wells mittels MTT	71
Analyse ankerunabhängigen Wachstums mittels Weichagar	72
4.4.2. Microarrayanalyse	73
Überlappungen von potentiellen Zielgenen der Transkriptionsfaktoren	75
4.4.3. GSEA basierte GO-Analyse	79
4.4.4. TRAP	83
FRA1	84
SRF	86
ELK3	86
4.4.5. Weitere Transkriptionsfaktoren	87
4.4.6. Zielgene der FRA1-abhängigen Transkription	89
Optimierung des PCR-Nachweises für die ChIP	91
FRA1-Zielgene	92
Regulation anderer Transkriptionsfaktoren	101
Analyse weiterer potentieller FRA1-Zielgene	103

5. Diskussion	108
5.1 Analyse RAS-MEK-abhängiger transkriptioneller Netzwerke	108
5.1.1 Aktive Signalwege in HA1EB und HA1ER und phänotypische Effekte	108
5.1.2 RAS-gesteuerte Netzwerke sind in hohem Maße interaktiv	108
5.1.3 SRF/ELK3 und FRA1 bilden kein direktes hierarchisches Netzwerk	110
5.1.4 ELK3, SRF und FRA1 sind Teile eines gemeinsamen Netzwerks	113
5.1.5 FRA1-Zielgene in HA1EB und HA1ER	115
5.1.6 Das Netzwerk direkter RAS- MEK/ERK-abhängiger FRA1 Zielgene	117
AEBP1	117
NPAS2	120
TCFL5	122
YWHAZ	123
5.1.7 Der mögliche Einfluss anderer Transkriptionsfaktoren und epigenetischer Regulatoren auf FRA1-Zielgene und mögliche Interaktionen von Zielgenen	125
5.2 Kritische Betrachtung der Versuchsanordnung, der angewandten Methoden und des verwendeten Zellsystems	126
5.2.1 Kombination von experimentellen und bioinformatischen Methoden	126
5.2.2 Die Verwendung des Zellpaares HA1EB und HA1ER	128
5.2.3 Der Mek/ERK- Inhibitor U0126	129
5.2.4 Bewertung der transienten siRNA vermittelten Hemmung	130
5.2.5. Bewertung der GO-, GSEA und TRAP-Analysen	131
GO-Analyse	131
GSEA und TRAP	131
5.3. Zusammenfassung und Ausblick	132
i Literaturverzeichnis	i
ii Anhang	xxii
Danksagung	ciii
Publikationsliste	civ
Selbständigkeitserklärung	cvi

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Eigenschaften von Tumorzellen (nach Hanahan et al. 2000)	1
Abb. 1.2: Aktivierungszyklus von RAS (nach Weinberg 2006)	3
Abb. 1.3: Übersicht MAPK-Signalwege und zugehörige Module (nach Chen et al. 2001)	10
Abb. 1.4: Aufbau der TCFs (nach Sharrocks et al. 2002)	13
Abb. 1.4: Übersicht AP1-Komponenten der bZIP Familie (aus Eychène et al. 2008)	16
Abb. 2.1: Schema der Arbeitsabläufe zur Bearbeitung der Problemstellung	21
Abb. 4.1: Morphologie HA1EB und HA1ER	48
Abb. 4.2: Zellzyklusanalyse von HA1EB und HA1ER	49
Abb. 4.3: Aktivierung der Ras-MEK/ERK-Kaskade in HA1EB und HA1ER	50
Abb. 4.4: Wachstumsverlauf HA1EB und HA1ER	51
Abb. 4.5: Graphische Darstellung der P-Werts (nach Christine Steinhoff)	53
Abb. 4.6: Expression von HMGA2, ETV1, ELK3 und FRA1	56
Abb. 4.7: Expression der Gene STAT1 (mit pSTAT1) und ATF3	56
Abb. 4.8 : Expression von cMYC und NMI	57
Abb. 4.9: SRF, CREB, ATF2, cFOS und cJUN, ETS1, EGR1 und TP53 Expression	58
Abb. 4.10: Überprüfung der SCR-Kontrollen am Bsp. von ATF3	60
Abb. 4.11: Etablierung der SRF-Hemmung mit den Oligos SRF-1, SRF-2 und SRF-3	62
Abb. 4.12: Etablierung der FRA1 Hemmung mit den Oligos FRA1-1 und FRA1-2	64
Abb. 4.13: Etablierung der ELK3-Hemmung mit den Oligos ELk3-1 und ELK3-2	65
Abb. 4.14: Versuch der ATF3-Hemmung mit den Oligos ATF3-1 und ATF3-2	66
Abb. 4.15: Versuch der HMGA2-Hemmung mit den Oligos HMGA2-1 und HMGA2-2	66

Abb. 4.16: Versuch der ETV1-Hemmung mit den Oligos ETV1-1 und ETV1-2	67
Abb. 4.17: Optimierung der Scherrate	68
Abb. 4.18: Immunprecipitattest FRA1(R20) LOT:E161 ,#sc-605, Santa Cruz	69
Abb. 4.19: Immunpräzipitation unspezifischer Antikörperchargen für FRA1	69
Abb. 4.20: Nachweis Spezifität des Antikörpers FRA1-N17 (sc-183, LOT:F1708)	70
Abb. 4.21: MTT-assay von SRF, FRA1 und ELK3-siRNA behandelten HA1ER	71
Abb. 4.22: Weichagarassay zur Analyse des ankerunabhängigen Wachstums	72
Abb. 4.23: Graphische Darstellung der analysierten Schnittmengen	76
Abb. 4.24: Übersicht Regulierung des GO-GSEA-Datensets „Transcription factor activity“ nach Hemmung von FRA1 in HA1ER- (abregulierte IDs)	81
Abb. 4.25: Etablierung der PCR-Bedingungen zur Amplifikation genspezifischer AP1-Bindestellen für die oben angegebenen Gene	91
Abb. 4.26: PCR der Positivkontrollen CCND1 und VEGFR für die FRA1-spezifische ChIP	92
Abb. 4.27: Expressionsänderung nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung und FRA1-ChIPAnreicherung von AEBP1, FRA1, TCF3 und TCFL5	94
Abb. 4.28: Expressionsänderung von NPAS2, SOX4 und PAX8 nach siRNA vermittelter FRA1-Hemmung	96
Abb. 4.29: Expressionsänderung von FOXL1, PCGF2, SLC2A4RG und SMARCA4 nach siRNA vermittelter FRA1-Hemmung	98
Abb. 4.30: Expressionsänderung von HIF1alpha, ETV1 und STAT3 nach siRNA vermittelter FRA1-Hemmung, sowie FRA1- ChIP-Anreicherung am STAT3-Promoter	100
Abb. 4.31: Expressionsänderung von HMGA1, HMGA und YWHAZ nach siRNA vermittelter FRA1-Hemmung, sowie FRA1- ChIP-Anreicherung am YWHAZ-Promoter	100
Abb. 4.32: Expressionsänderung von SP1 und FOXO3A nach FRA1-Hemmung, sowie FRA1- ChIP-Anreicherung am SP1 und FOXO3A-Promoter	102
Abb. 4.33: Expressionsänderung von AREB6 und E2F1 nach siRNA vermittelter FRA1-Hemmung	103

Abb. 4.34.: Expressionsänderung von OAS1, OAS2, OAS1 und SP110 nach siRNAver-	104
mittelter FRA1-Hemmung und FRA1-ChIP-Anreicherung am OAS1-Promoter	
Abb. 4.35: Expressionsänderung von COL6A1, ECM1 und ECM2 nach siRNA-	105
vermittelter FRA1-Hemmung und FRA1-ChIP-Anreicherung am COL6A1-Promoter	
Abb. 4.36: Expressionsänderung von RASSF1, WEE1, CXCL6, EFNA1 und CDC42 nach	106
siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung	
Abb. 5.1: Schema der hierarchischen FRA1-Transkriptionsregulation (nach Talotta et al. 2009)	111
Abb. 5.2: Beispiele gemeinsamer Zielgene von SRF, ELK3 und FRA1 in HA1EB und	113
HA1ER sowie Funktionen der Zielgene	
Abb. 5.3.: spezifische funktionelle Gruppen von FRA1-Zielgenen im Vergleich HA1EB	116
und HA1ER	
Abb. 5.4.: AEBP1 abhängig gesteuerte Funktionen	120
Abb.5.5: NPAS2 Funktionen	122
Abb. 5.6: RAS-FRA1-abhängig gesteuertes transkriptionelles Netzwerk unter Einbin-	124
dung der neu identifizierten FRA1 Zielgene	

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: FRA1 Indikationen in humanen Tumoren und Tumorzelllinien	16
Tab. 1.2: bekannte Zielgene von AP1/FRA1	19
Tab. 3.1: Zelllinien	22
Tab. 3.2: Medien	22
Tab. 3.3: Transfektionsreagenzien	22
Tab. 3.4: verwendete Inhibitoren	22
Tab. 3.5: Scrambled siRNAs Sequenzen SCR0-2	22
Tab. 3.6: siRNAs selbst konstruiert	23
Tab. 3.7: siRNAs kommerziell	23
Tab. 3.8: Blockpeptid	23
Tab. 3.9: verwendete Fluoreszenzmarkierte Primär-Antikörper (Durchflusszytometrie)	23
Tab. 3.10: verwendete Primärantikörper	24
Tab. 3.11: verwendete Sekundärantikörper	24
Tab. 3.12: RT-PCR-Primer	24
Tab. 3.13: ChIP-PCR-Primer	25
Tab. 3.14: Taqmanassays (Applied Biosystems)	25
Tab. 3.15: verwendete Kits	26
Tab. 3.16: verwendete Antibiotika	26
Tab. 3.17: Sonstige Chemikalien	26
Tab. 3.18: Fortsetzung sonstige Chemikalien	27
Tab. 3.19: Stammlösungen und Puffer	27
Tab. 3.20: Fortsetzung Stammlösungen und Puffer	28
Tab. 3.21: Fortsetzung Stammlösungen und Puffer	29
Tab. 3.22: Verwendete Software	29
Tab. 3.23: Geräte und Verbrauchsmaterial	29
Tab. 3.24: Fortsetzung Geräte und Verbrauchsmaterial	30
Tab. 3.25: Übersicht transfizierter Vektoren und Eigenschaften	31
Tab. 3.26: Pipettierschema PCR	36

Tab. 3.27: Pipettierschema RT-PCR	37
Tab. 3.28: Pipettierschema RT-Taqman.	37
Tab. 3.29: Pipettierschema Taqman	37
Tab. 3.30: PCR-Protokolle	37
Tab. 3.31: Fortsetzung PCR-Protokolle	38
Tab. 3.32: Verwendete Fluoreszenzkombination	38
Tab. 3.33: Zusammensetzung Polyacrylamidgele	41
Tab. 3.34: Messparameter für die Durchflusszytometrie	43
Tab. 4.1: analysierte Datensets	52
Tab. 4.2: signifikant RAS-abhängig regulierte Zielgene	54
Tab. 4.3: weitere Zielgene	55
Tab 4.4: Parameter zur Optimierung der Scherrate	68
Tab. 4.5: Hybridisierte Proben der SRF-, FRA1- und ELK3-siRNA-Experimente	73
Tab. 4.6: Kontrollgenvergleich BLINDa vs. BLINDb	74
Tab. 4.7.: Vergleich SCR-1 und SCR-2 zu BLIND	74
Tab 4.8: Regulierte Gene nach der siRNA Hemmung von SRF-, ELK3- und FRA1	75
Tab. 4.9: generierte Schnittmengen der regulierten Gene (P-Wert< 0,05)	75
Tab. 4.10: GSEA-GO-Analyse regulierter Gene der siRNA-Experimente in HA1EB und HA1ER	80
Tab. 4.11: GSEA-GO-Analyse regulierter Gene der FRA1- siRNA-Experimente in HA1ER	80
Tab. 4.12: Differentiell regulierte Gene („transcription factor activity“) aus der GSEA-GO-Analyse in FRA1-siRNA-behandelten HA1ER-Zellen	81
Tab. 4.13: Fortsetzung differentiell regulierte Gene („transcription factor activity“) aus der GSEA-GO-Analyse in FRA1-siRNA-behandelten HA1ER-Zellen	82
Tab. 4.14: TRAP-Analyse der differentiell aufregulierten Gene („transcription factor activity“) in FRA1-siRNA-behandelten HA1EB	84
Tab. 4.15: TRAP-Analyse der differentiell abregulierten Gene („transcription factor activity“) in FRA1-siRNA-behandelten HA1EB	85
Tab. 4.16: TRAP-Analyse der differentiell abregulierten Gene („transcription factor activity“) in FRA1-siRNA-behandelten HA1ER	85
Tab. 4.17: TRAP-Identifizierung weiterer Transkriptionsfaktorbindematrizen an Promotern von SRF, FRA1 und ELK3 Zielgenen in HA1EB und HA1ER	88
Tab. 4.18: Zusammenfassung Zielgenvalidierung	90

Tab. 4.19: Expressionsregulierung differenziell regulierte Gene der GSEA-GO und TRAP-Analyse, die Verifizierungsexperimenten mittels qPCR und ChIP unterzogen wurden	92
Tab. 4.20: Fortsetzung Expressionsregulierung differenziell regulierte Gene der GSEA-GO und TRAP-Analyse, die Verifizierungsexperimenten mittels qPCR und ChIP unterzogen wurden	93
Tab. 4.21: Expressionsänderung weiterer möglicher FRA1-abhängiger Transkriptionsfaktoren nach siRNA vermittelter FRA1-Hemmung in HA1EB und HA1ER	99
Tab. 4.22: Expressionsänderung weiterer Transkriptionsfaktoren nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung in HA1EB und HA1ER	101
Tab. 4.23: Regulierung weiterer FRA1-Zielgene	103
Tab. 4.24: Fortsetzung Regulierung verschiedener weiterer FRA1-Zielgene	104
Tab. I: durch U0126-Behandlung signifikant regulierte Gene in HA1ER	xxii
Tab. II: P-Werte und GO-Analyse „transcription“ von U0126-behandelten HA1ER-Zellen	xxxviii
Tab. III regulierte Gene nach SRF siRNA vermittelte Inhibition in HA1EB, P-Wert < 0,05	xxxvix
Tab. IV: regulierte Gene nach FRA1 siRNA vermittelte Inhibition in HA1EB, P-Wert < 0,05	li
Tab V: regulierte Gene nach ELK3 siRNA vermittelte Inhibition in HA1EB, P-Wert < 0,05	lxv
Tab. VI: regulierte Gene nach SRF siRNA vermittelte Inhibition in HA1ER, P-Wert < 0,05	lxxii
Tab. VII: regulierte Gene nach FRA1 siRNA vermittelte Inhibition in HA1ER, P-Wert < 0,05	lxxxvii
Tab. VIII: regulierte Gene nach ELK3 siRNA vermittelte Inhibition in HA1ER, P-Wert < 0,05	xcii
Tab. IX: GO-Analyse („Biological process“) der Transkriptionsfaktoren der Schnittmengen von SRF, FRA1, ELK3 in HA1EB und HA1ER	xcvii
Tab. X: GO-Analyse („Biological Process“) der Transkriptionsfaktoren der Schnittmengen der Expressionsprofile SRF- und FRA1-siRNA-behandelter Zellen	xcviii
Tab. XI: GO-Analyse der Transkriptionsfaktoren, die von SRF, FRA1 und ELK3 in HA1ER angesteuert werden	xcviii
Tab. XII: SRF-siRNA-abhängig regulierte Gene mit höchster Anreicherung der TRAP-Affinitäten für SRF	xcix
Tab. XIII: ELK3-siRNA-abhängig regulierte Gene mit höchster Anreicherung der TRAP-Affinitäten für ELK3 c	c
Tab. XIV: Ras ERK-abhängig regulierte ATF3-Zielgene in HA1ER	ciii

IV Abkürzungsverzeichnis

IV.1 offizielle Bezeichnungen umgangssprachlich verwendeter Gene

ALPHACP1	PCBP, poly(rC) binding protein
AP2	TFAP2A, transcription factor AP-2 alpha
aP2	FABP4, fatty acid binding protein 4
AREB6	ZEB1, zinc finger E-box binding homeobox 1
ASK1	MAP3K5, mitogene-activated protein kinase kinase kinase 5
BMAL	ARNTL, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
C/EBP	CEBPA, CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
CCNB	CCNB1, cyclin B 1
CEBP	CEBP1, cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
cFOS	FOS, FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
cJUN	JUN, jun oncogene
CMYC	MYC, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
CREB	CREB1, cAMP responsive element binding protein 1
CREL	REL, v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
CtBP	CTBP1, C-terminal binding protein 1
CTF	NFIC, nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)
CTP	SLC25A1, solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1
CXorf45	ALG13, asparagine-linked glycosylation 13 homolog (S. cerevisiae)
EIF4	eukaryotic translation initiation factor 4
ErbB	v-erb-b2 erythroblastic leukaemia viral oncogene homolog
ERK	MAPK1, mitogen-activated protein kinase 1
EVI1	RUNX1, runt-related transcription factor 1
FASL	FASLG, Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
FRA1	FOSL1, FOS-like antigen 1
GATA	GATA binding protein (1-4 isoforms)

HIF1alpha	HIF1A, hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
HIF3alpha	HIF3A, hypoxia inducible factor 3, alpha subunit
HIST1	HIST1H1A, histone cluster 1, H1a
HIST3	HIST2H3C, histone cluster 2, H3c
HO1	HMOX1 heme oxygenase (decycling) 1
HS1	YWHAB, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide
HTERT	TERT, telomerase reverse transcriptase
IL1	Interleukin 1 A or B
IPF1	PDX1, pancreatic and duodenal homeobox 1
IRF	TRIM63, tripartite motif-containing 63
JAK	Janus Kinase
LXR	NR1H2,3, nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
MEK	MAP2K1,2, mitogen-activated protein kinase kinase 1,2
MLK	MAP3K11, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11
MMP	matrix metalloproteinase
MNK	MKNK1, MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1
MSK	SIK1, salt-inducible kinase 1
MSL3L1	MSL3, male-specific lethal 3 homolog
NFAT	NFATC1,2, nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1,2
NFKB	NFKB1, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFY	NFYA, nuclear transcription factor Y, alpha
NGFIC	EGR4, early growth response 4
NKX3A	NKX3-1 NK3 homeobox 1
NORE1	RASSF5, Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5
NOS	NOS1, nitric oxide synthase 1 (neuronal)
Nur77	NR4A1, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
OCT4	POU5F1, POU class 5 homeobox 1

P53	TP53, tumor protein p53
PAI1	SERPINE1, serpin peptidase inhibitor, clade E
PI3K	PIK3CA,B,C phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha, beta, gamma polypeptide
PPARgamma	PPARG, peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RAC	RAC1, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAF	ARAF/BRAF/RAF1,v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog /B1/1
RAL	RALA/B, v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A/B
RARalpha	RARA, retinoic acid receptor, alpha
RSK	RPS6KA1, ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1
RxRalpha	RXRA, retinoid X receptor, alpha
RY1	SNRNP27 small nuclear ribonucleoprotein 27kDa (U4/U6.U5)
SAP1	ELK4, ETS-domain protein
SGK	SGK1, serum/ glucocorticoid regulated kinase 1
SHC	SHC, Src homology 2 domain containing
SNX26	ARHGAP33 Rho GTPase activating protein 33
TAK1	MAP3K7, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
TAO1	TAOK1, TAO kinase 1
TEL/ABL	ETV6 , ets variant 6
TGFB	TGFB1, transforming growth factor, beta 1
TIF1alpha	TRIM24, tripartite motif-containing 24
VEGFR	KDR, kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)

IV.2 sonstige Biomoleküle

cDNA	complementary DNA
CID	common inhibitory domain
DG	delayed genes
DNA	DNS, Desoxyribonukleinsäure

EBS	ETS binding site
ECM	extra cellular matrix
GAP	GTPase-Activating Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	histone acetyltransferases
HDAC	histone deacetylases
IEG	immediate early genes
ISRE	IFN-stimulated response elements
JNK	cJUN NH2-terminalen Kinasen (JNK)
MRTF	myocardin-related <i>transcription</i> factor
NES	nuclear exclusion sequence
NID	new inhibitory domain
RNA	RNS, Ribonukleinsäure
SRE	serum responsive element
SV40-ER	SV40-early region
TAD	transcription activation domain
TCF	ternary complex factors
TRE	TPA (12-O-Tetradodecanoylphorbol-13-Acetat) Responsive Element“

IV.3 Material und Methoden

(v/v)	Volumen/Volumenverhältnis
(w/v)	Masse/Volumenverhältnis
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
ECL	enhanced chemoluminescence
FCS	fetal calf serum
FL	Fluoreszenzkanal

GO	Gene Ontology
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
ID	Identifier
IFS	inaktiviertes fötales Serum
MEM-Alpha	minimal essential medium (MEM), Alpha modification
MTT	MTT-Test, MTT=3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumjodid
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
SCR	Scrambled
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered Saline
TBST	Tris buffered Saline with Tween
TE	Tris-EDTA
TRAP	Transcription Factor Affinity Prediction
WB	Westernblot

V. Zusammenfassung

Transkriptionelle Netzwerke (Transkriptionsfaktoren, epigenetische Modulatoren und spezifische Zielgene) stellen die unterste Ebene der zellinternen Signalübertragung dar. Eingebettet in verschiedene stimulusabhängige Signalwege bedienen sich ihre Komponenten genetischer und epigenetischer Mechanismen, um Zielgene transkriptionell zu regulieren und Veränderungen der Chromatinstruktur hervorzurufen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die hierarchische Organisation und Zusammensetzung des MEK-ERK-abhängig gesteuerten transkriptionellen Netzwerks und seine Veränderung im Zuge der HRAS-vermittelten onkogenen Transformation von HA1-Zellen untersucht. Viele Arbeiten haben sich bereits eingehend mit der Charakterisierung einzelner Komponenten und Zielgene beschäftigt (Wagner et al. 2005, Reddy et al. 2002, Sun et al. 2006, Kapitel 1). Im Unterschied zu den zitierten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit ein umfassendes Protokoll zur genomweiten Decodierung transkriptioneller Netzwerke unter Kombination von experimentellen und bioinformatischen Methoden entwickelt und durchgeführt. Die Analyse genomweiter Expressionsprofile un- und U0126-behandelter immortaler und HRAS^{V12}-transformierter humaner Nierenepithelzellen (HA1EB, HA1ER) erlaubte die Identifizierung von 138 auf- und 103 abregulierten genspezifischen IDs der RAS-ERK-abhängig gesteuerten Signalkaskade. Regulierte Transkriptionsfaktoren wurden identifiziert und im Westernblot, sowie zum Teil mittels Durchflusszytometrie und RT-PCR validiert und nachfolgend transienten siRNA-Experimenten unterzogen. Für die Transkriptionsfaktoren ELK3, SRF und den hierarchisch darunter liegenden Faktor FRA1 wurden Expressionsprofile der spezifischen siRNA-vermittelten Hemmung in beiden Zelllinien erstellt und mit bioinformatischen Methoden (TRAP, GSEA-GO) analysiert um direkte und indirekte sowie gemeinsame Zielgene zu ermitteln. Zusätzlich wurde der Effekt auf phänotypischer Ebene (Softagar, MTT) überprüft.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich keine direkte Hierarchie der drei Transkriptionsfaktoren SRF, FRA1 und ELK3 bestätigen. Allerdings konnte zum ersten Mal eine gemeinsam regulierte Gruppe von Genen identifiziert werden, die darauf schließen

lässt, dass die drei Transkriptionsfaktoren sowohl in HA1EB, als auch in HA1ER Teile eines gemeinsam regulierenden Netzwerks sind. Aus den Proliferationsexperimenten wurde zudem bestätigt, dass jeder Transkriptionsfaktor individuell eine essentielle Rolle bei der Promotion maligner Eigenschaften spielt. Für alle drei Transkriptionsfaktoren konnte eine RAS-abhängige starke Verschiebung der spezifisch angesteuerten Gene nachgewiesen werden. Diese Verschiebung wurde mittels TRAP und GSEA auch für alternative Regulatoren der spezifischen Zielgene festgestellt.

Die nähere Analyse der FRA1-abhängigen Zielgene führte zu neuen Erkenntnissen zur Umordnung des Transkriptoms im Zuge der onkogenen Transformation. Die FRA1-spezifischen Zielgene in HA1EB und HA1ER weisen unterschiedliche Funktionalitäten auf. So wurden in HA1EB viele Gene identifiziert, die im Rahmen der Immunantwort eine Rolle spielen und in HA1ER nicht reguliert werden. In den RAS-transformierten HA1ER konnten dagegen Gene identifiziert werden, die in der Tumorprogression eine Rolle spielen (FRA1, STAT3, MTA1, TCFL5). Die Verifizierungen mittels qPCR und ChIP bestätigten 5 der 38 möglichen FRA1-Zielgene. Von diesen, FRA1, AEBP1, FRA1, TCFL5, NPAS2 und YWHAZ ist lediglich FRA1 bereits als FRA1-Zielgen beschrieben. Die Funktionen der neu identifizierten RAS-abhängigen FRA1-Zielgene untermauerten bereits bekannte Funktionen der FRA1-vermittelten Transkription (Differenzierung, Proliferation, zirkadiane Rhythmen, Apoptose) und erweitern sie um verschiedene Aspekte wie Metabolismus und Rückkopplungen in die Signaltransduktion, die noch nicht für die RAS-abhängige FRA1-vermittelte Transkription beschrieben worden sind. Dazu gehören unter anderem Interaktionen mit TGFbeta, WNT, JAK/STAT und JNK. Daneben sind in den HA1ER eine Vielzahl von Regulatoren des RHO-Signalwegs identifiziert worden, was für FRA1 auf bisher unbekannte Interaktionen mit RAC/RHO-Signalwegen schließen lässt.

VI. Abstract

Transcriptional networks represent the final level of internal signal transmission. They are embedded in different signalling pathways and use genetic as well as epigenetic mechanisms to regulate their according target genes. During oncogenic transformation they are undergoing massive rearrangements in composition, regulation and interaction. This leads to radical changes in the transcriptome and drives the oncogenic phenotype of the according cells.

My thesis employs the composition of the MEK-ERK-dependent transcriptional network and its alteration during the HRAS-oncogene-mediated transformation in HA1-cells. By commencing from already known components: SRF, Ternary Complex Factors (TCF: SAP1, SAP2/ELK3, ELK1) and members of the AP1-complex (JUN, FOS-proteins) I analyzed the alteration in expression of secondary targets and their interaction as well as their relation to the superior factors.

Therefore I compared genome wide expression profiles (Affymetrix, HG-U133A) of immortal HA1EB and HRAS^{V12}-oncogene-transformed HA1ER-cells with and without U0126-induced MEK/ERK-inhibition and extracted several MEK/ERK-dependent transcription factors. Among them where FRA1 and ELK3, two transcription factors already known to be involved in oncogenesis and proliferation associated processes. ELK3 needs SRF as crucial binding partner to function. Therefor I also included SRF into the subsequent analysis. The three transcription factors function in different time-dependent hierarchy states so we supposed a putative hierachical network between them. I established transient knockdown cells deriving from HA1EB and HA1ER for all three transcription factors and generated further expression profiles from them. Additionally I verified the importance of these transcription factors on survival and proliferation via MTT and Softagar experiments. Using different statistically and bioinformatical methods (GSEA, TRAP) in collaboration with the Max-Planck-Institute for molecular Genetics Berlin, several direct and indirect targets of these transcription factors were predicted. These were partially overlapping in all transcription factors. Also, in comparison of the immortal and the transformed cell line, a shift of functionalities and composition of the different target gene populations

and collaborating factors could be detected for all three transcription factors. It was found that in HA1EB FRA1 seems more likely to regulate immunoresponsive genes as well as genes associated with the cytoskeleton and nucleus organisation whereas in HA1ER FRA1 regulates a large group of transcription- and signalling-associated genes. Additionally it could be shown that in both cell lines FRA1 regulates genes involved in epigenetic processes as well as circadian rhythms which are known to be important aspects in oncogenic transformation.

I verified 37 different putative target genes of FRA1 using qRT-PCR (Taqman) and partially also ChIP-analysis. Of these 37 genes, 5 were fully validated as directly regulated targets of FRA1: FRA1, AEBP1, YWHAZ, NPAS2 and TCFL5.

They imply functionalities connected to proliferation and differentiation (AEBP1, FRA1, TCFL5) as well as apoptosis (YWHAZ) cell cycle control and circadian rhythm (NPAS2, AEBP1), feedbacks into the signalling (YWHAZ, AEBP1) and metabolism (NPAS2, AEBP1).

Summarised the work of this thesis contributes to the decipherment of the direct and indirect targets of the according transcription factors and strengthens the argument of a general and massive shift of the transcriptional network during oncogenic transformation of cells. The importance of all three transcription factors on the survival of genes could be proved via proliferation assays. Additionally the functionality of their according targets could be integrated into processes connected to oncogenic transformation.

1. Einleitung

1.1 Genregulation und Onkogenese

Die Regulation von Transkription und Translation unterliegt in Säugerzellen einem komplexen Netzwerk verschiedener Faktoren. Äussere und innere Stimuli beeinflussen die Signaltransduktionsprozesse der Zelle für die kurzzeitige oder langfristige Veränderung der transkriptionellen Maschinerie, um zellspezifische Aufgaben zu koordinieren und sich den Umweltbedingungen adäquat anzupassen. Diese Koordination ist in Tumorzellen durch Prozesse der „gain of function“ (Onkogene) und „loss of function“ (Tumorsuppressorgene) gestört und kann durch Mutationen, Deletionen, Insertionen oder Transitionen ausgelöst sein (Bishop et al. 1996). Der Phänotyp von Tumorzellen wird durch 4-7 dieser Ereignisse bedingt und führt zur nachhaltigen Veränderung des Transkriptoms, Proteoms und Metaboloms (Vogelstein et al. 2004, Beerwinkel et al. 2007, Weinberg 2006) (**Abb. 1.1**). Die Zellen erwerben bei der Transformation die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation (Immortalisierung) und konstitutiven Aktivierung proliferativer Signalwege. Die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und die Reaktivität gegenüber äusseren Signalen ist eingeschränkt. Es kommt häufig zu Folgemutationen, die aufgrund der eingeschränkten Apoptosefähigkeit der Zellen nicht zum kontrollierten Zelltod führen (Hanahan et al. 2000). Aggressive Tumore zeigen zudem eine Erhöhung des invasiven und metastasierenden Potentials.

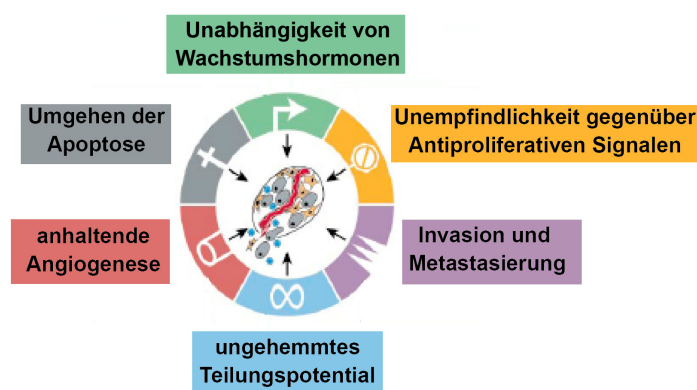


Abb. 1.1: Eigenschaften von Tumorzellen (nach Hanahan et al. 2000)

Mutationen, Deletionen, Insertionen oder Transitionen im Genom von Zellen bewirken den Erwerb charakteristischer maligner Eigenschaften. Diese haben allgemeingültigen Charakter.

1.2 RAS-Netzwerke

1.2.1 RAS-Proteine

Die RAS (Rat Sarcoma)-Proteine H-(Harvey)-, K-(Kirsten)-, K4A- und N-(Neuroblastoma)-RAS gehören zu Klasse der GTP- (Guanosintriphosphat)-Hydrolyse gekoppelten Signaltransduktionsproteine (Colicelli et al. 2004, Krauss 2001). Dabei handelt es sich um membranständige Proteine, die bis auf die beiden K-RAS-Splicingformen KRAS und K4ARAS in unabhängigen Genen kodiert sind (Castellano et al. 2007). H-, K- und N-RAS nehmen in der Zelle eine zentrale Funktion bei der Signaltransduktion ein, die an eine Vielzahl von Effektoren geknüpft ist (Krauss 2001, Katz et al. 1997, Karnoub et al. 2008, Castellano et al. 2007). Zu diesen gehören Regulatoren des Zellwachstums und der Differenzierung sowie der Stressantwort und der Apoptose (Colicelli et al. 2004). Die Expression der RAS-Gene ist in Normalzellen ähnlich, allerdings nehmen die RAS-Isoformen unterschiedliche Funktionen in der Zelle ein und sind nur bedingt austauschbar (Leon et al. 1987, Su et al. 2004).

1.2.2 Signalübertragung und RAS-Aktivierung

H-, N- K-RAS und KRAS4A sind monomere GTPasen von 21 kDa (Karnoub et al. 2008), die in GTP und GDP-gebundenen Zuständen existieren. Sie können extern über die Interaktion von Liganden mit Rezeptortyrosinkinasen, Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen, sowie G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Reuther et al. 2000, Karnoub et al. 2008). Zu den Liganden letzterer gehören Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, Zytokine und Hormone (Weinberg 2006). Die Signale werden über Adaptermoleküle (GRB2, SHC) an die GEFs („Guanin nucleotide exchange factors“) weitergegeben, die das Binden von GTP an RAS katalysieren und dieses aktivieren (Karnoub et al. 2008). Alternativ ist auch eine Aktivierung über Ca²⁺-/ Diacylglycerinsignalwege (Hirn) und NO-Signalwege (Nerven) möglich.

Die Inaktivierung von RAS wird durch das Binden von GAPs („GTPase activating proteins“) gesteuert, da RAS selbst nur eine geringe intrinsische GTPase-Aktivität besitzt (Colicelli et al. 2004). Um gebundenes GDP abzuspalten und neues GTP zu

binden, benötigt RAS die Interaktion mit GEFs (Krauss 2001). Der Aktivierungszyklus (**Abb. 1.2**) wird durch die abwechselnde Aktivität der GAPs und GEFs bestimmt.

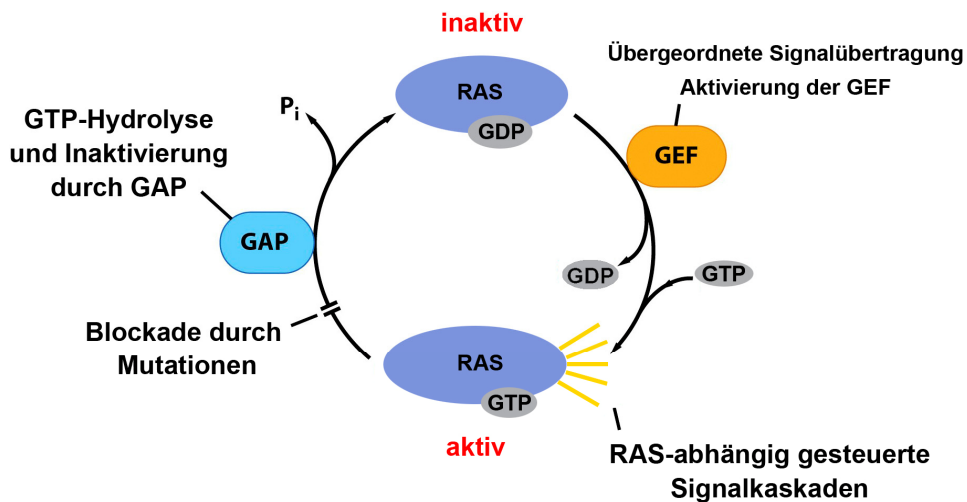


Abb. 1.2: Aktivierungszyklus von RAS (nach Weinberg 2006)

Steuerung der RAS-Aktivierung durch GEF und GAP

1.2.3 Direkte Effektoren von RAS

RAF

RAF verbindet die Signale, die über RAS prozessiert werden, mit der mitogenen MEK-ERK-Kaskade (siehe Kapitel 1.3.3 und 1.4). Es sind verschiedene Isoformen von RAF bekannt (A, B, C), die gewebeabhängig spezifische Funktionen innehaben. Die Regulation der RAF-Aktivierung ist komplex und beinhaltet sowohl inter- und intramolekulare Proteininteraktionen, als auch Phosphorylierungen (Dougherty et al. 2005). C-RAF kann über direkte negative Autoregulation in seiner Aktivität gehemmt werden. Durch Mutationen kann RAF onkogene Eigenschaften erwerben (Colicelli et al. 2004) und den darunter liegenden MEK-ERK-Signalweg konstitutiv aktivieren (Karnoub et al. 2008).

Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-kinase (PI3K)

Ein weiterer RAS-Effektor ist die Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-kinase (PI3K). Nach der Aktivierung durch RAS kann die Kinase über Effektorproteine wie PDK1, AKT und RAC mitochondriale Proteine der BCL2-Klasse regulieren (Colicelli et al. 2004, Downward et al. 1998). Diese steuern die Apoptose (Weinberg et al. 2006), aber auch die Organisation des Zytoskeletts (Pollock et al. 2005). Die PI3K ist ein wichtiges Element der zellulären Transformation, da ihre konstitutive Aktivierung auch beim Vorliegen genetischer Schäden Apoptose verhindert. Zudem verändert die PI3K zum Teil die Motilitätseigenschaften der Zelle, was für die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen eine entscheidende Rolle spielt.

GEFs der RAL-Proteine

Durch die Interaktion mit RAS wird die Nukleotidaustauschaktivität der GEFs RALGDS, RGL1 und RGL2 (Colicelli et al. 2004) beeinflusst. Dies führt zur Aktivierung von RalA und RalB, deren Signalkaskaden ebenfalls an der onkogenen Transformation von Zellen beteiligt sind (Karnoub et al. 2008). Der RalGDS-Signalweg ist in die Regulation der Proliferation und Apoptose sowie der Exozytose, Endozytose und der zellulären Motilität involviert (Smith et al. 2009).

Weitere

RAS kann die Aktivität von weiteren Proteinen (RIN1, RIN2, RIN3, NORE1, RASSF1, RASSF6, PLCE1, MLLT4 und RASIP1) steuern. Diese nehmen, wie RIN1, zum Teil eine kompetitive Stellung zu anderen RAS-Effektoren ein (Colicelli et al. 2004) oder können, wie RASSF1, als Tumorsuppressoren wirken (Vos et al. 2006)

1.2.4 Mutationen und Bedeutung für die Tumorgenese

RAS-Gene gehören zu den am häufigsten mutierten Onkogenen in Säugern. Ca. 30 % aller Tumorerkrankungen sind durch RAS-Mutationen charakterisiert (Colicelli et

al. 2004). Diese finden am 12ten, 13ten oder 61ten Codon statt (Weinberg 2006). Sie bewirken einen Aminosäureaustausch als dessen Folge keine Bindung von GAP/GEFs an RAS mehr möglich ist. Dies verhindert die Hydrolyse von gebundenem GTP (Chipperfield et al. 1985) und führt zu einer permanenten Aktivierung von RAS (**Abb. 1.2**) mit drastischen Folgen für darunterliegende Signalwege und den Phänotyp. Betroffene Zellen zeigen neben dem Verlust der Apoptosefähigkeit und einer erhöhten Proliferation auch epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Die Transition geht mit einer Abschwächung von Zell-Zell-Interaktionen und verstärkter Motilität einher (Schoenenberger et al. 1991, Birchmeier et al. 1993, Hay et al. 1995), was in Tumoren mit Invasivität und Metastasierung in Verbindung steht (Lehmann et al. 2000, Pollock et al. 2005). Für HRAS ist zudem gezeigt worden, dass eine erhöhte Expression des Proteins mit ankerunabhängigem Wachstum gekoppelt ist und einen Rückschluss auf den Grad der Malignität von Tumorerkrankungen zulässt (Chang et al. 2003, Kim et al. 1991)

1.3 MAPK Signalwege

1.3.1 Allgemeines

Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)- Signalwege spielen bei der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. Sie übertragen Informationen von der Zellmembran zum Kern und vermitteln eine zelluläre Antwort auf unterschiedliche Stimuli. Darunter finden sich kurzfristige Änderungen zur Beibehaltung der zellulären Homöostase sowie langfristige Veränderung zur Vermittlung von Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Martin et al. 2005, Robinson et al. 1997, Chen et al. 2001). In vielen Tumoren sind MAPK-Signalwege durch Mutationen (RAS oder RAF) konstitutiv aktiv (Hornberg et al. 2004) und so an der Ausbildung des malignen Phänotyps beteiligt (Chen et al. 2001).

In Säugerzellen sind bisher 20 MAPK identifiziert worden (Chen et al. 2001, Garington et al. 1999), darunter ERK1, ERK2, JNK, ERK5/BMK1 und p38 (Roux et al. 2004). Sie beinhalten das Phosphorylierungsmotiv TxY (Threonin, x= beliebig, Tyrosin), über

das ihre Aktivierung vermittelt wird (Krauss 2001, Chen et al. 2001). Die Inaktivierung erfolgt über Phosphatasen (Serin/Threonin, Tyrosin oder Threonin-/Tyrosin-Phosphatasen), wie z.B. dualspezifische Threonin-Tyrosin-Phosphatasen (DUSPs). MAPK phosphorylieren Serin-Threonin-Reste sowie Prolinreste. Dies führt zu einer Änderung des Aktivitätsstatus der spezifischen Zielproteine (Chen et al. 2001).

Die verschiedenen MAPK sind mit unterschiedlichen biologischen Funktionen verknüpft. So sind JNK- und p38-Signalwege eher mit stressvermittelnden Stimuli assoziiert, während ERK1/2 an der Vermittlung proliferativer Signale beteiligt ist. Die Aktivierung der einzelnen MAPK-Signalwege und der nachfolgenden Faktoren unterliegt einem stimulusabhängigen Gleichgewicht. Dabei kommt es zu Überlappungen der Signalwege und zur gemeinsamen Ansteuerung von Zielgenen und Proteinen. (Xia et al. 1995).

1.3.2 Module und Signalleitung

MAPK sind in Signalwege eingebettet, die von Transmembranrezeptoren (z.B. EGFR) und nachfolgenden Signalmolekülen (z.B. RAS) ausgehen. Sie bestehen aus drei Folgekinasen, den MAPKKK (MAPKK-Kinasen, MEKKs), MAPKK (MAPK-Kinasen, MEKs) und MAPK (Chen et al. 2001). Die Proteine sind in Modulen organisiert, die durch spezifische Gerüst- oder Adaptermoleküle räumlich assoziiert sind (Chen et al. 2001, Whitman et al. 1998, Yang et al. 2003).

Die Aktivierung der einzelnen Glieder der Signalkette erfolgt über duale Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten (MAPKKK, MAPKK) bzw. an Threonin- und Tyrosinresten (MAPK). Die kaskadenartige Signalweiterleitung über die verschiedenen Moleküle ermöglicht ihre effiziente Regulation. Dadurch kann die Zelle flexibel auf äussere und innere Stimuli reagieren (Krauss 2001, Yang et al. 2003). Die Interaktion mit den Substraten der MAPK wird über verschiedene Dockingdomänen vermittelt die für Transkriptionsfaktoren (DEF-Motiv) und untergeordnete Kinasen (MK-Motiv) spezifisch sein können (Roux et al. 2004, Dimitri et al. 2005).

1.3.3 ERK1 und ERK 2

Die MAPK ERK1 und ERK2 sind terminale Kinasen der RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade (Ebisuya et al. 2005). Beide Proteine werden in allen Geweben und in end-differenzierten Zellen exprimiert (Chen et al. 2001). Die übergeordnete Signalkaskade kann durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, TGF, osmotischen Stress, TNFalpha, Interleukine, Mikrotubulinorganisation sowie terminale, gewebespezifische Faktoren aktiviert werden (Chen et al. 2001, Krauss 2001).

Aktivierungsmechanismen und Lokalisationsregulation

Die Phosphorylierung von ERK1/2 wird durch MEK1/2 gesteuert. MEKs binden ERK1/2 an ihrer N-terminalen Bindestelle und phosphorylieren es durch ihre C-terminale katalytische Domäne an Tyrosin und Threoninresten. ERK kann im aktiven Zustand an die jeweiligen Substrate binden und eine Phosphorylierung an diesen katalysieren. Dabei ist es in der Lage, Substrate sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zu phosphorylieren. Das Lokalisationsverhältnis Zellkern/Zytoplasma ist vom Zelltyp und der Aktivierung übergeordneter Kinasen abhängig (Chen et al. 2001). Die nukleäre Akkumulation von ERK ist ein entscheidender Faktor der onkogenen Transformation (Tanoue et al. 2003) und wird durch die Dimerisierung von ERK gefördert. Zur nukleären Translokation muss ERK an MEK gebunden werden, da ERK nicht über eine nukleäre Lokalisationssequenz oder NES (nuclear exclusion sequence) verfügt (Chen et al. 2001, Ebisuya et al. 2005). Alternativ kann eine Interaktion mit inaktivierenden Phosphatasen (DUSP6, DUSP4, DUSP10) einen Transport von ERK ins Zytoplasma begünstigen (Ebisuya et al. 2005).

Aktivitätsregulation

Die Aktivierung wird über die Dauer und Stärke des eingehenden Signals gesteuert. Neben zytoplasmabasierten Mechanismen über die RAS-ERK-Kaskade ist auch eine Aktivierungsregulierung über nukleäre Hormonrezeptoren wie Östradiolrezeptoren oder Thyroxin möglich (Ebisuya et al. 2005).

Substrate und Zielmotive

ERK phosphoryliert Proteine an Serin- und Threoninresten, meist gefolgt von Prolinresten (Tanoue et al. 2003). Zu den Substraten gehören untergeordnete Kinasen (RSK1-3, MAPKAP2-3, MNK1-2) sowie zytoskelettale Proteine, Membranproteine, zytoplasmatische Proteine und nukleäre Proteine wie Transkriptionsfaktoren. Dabei sind stimuluspezifisch verschiedene Antworten provozierbar, abhängig von der Länge und Höhe der ERK-Aktivierung (Ebisuya et al. 2005, Hornberg et al. 2004). So kann z.B. ein hoher ERK-Spiegel zu Zellzyklusarrest und CCND1 Hemmung führen (Hornberg et al. 2004), obwohl eine hohe Aktivierungsrate normalerweise mit CCND1-Aktivierung assoziiert ist (Yamamoto et al. 2006).

Im Nukleus werden eine Reihe von Faktoren phosphoryliert, die für die Regulation der Proliferation wichtig sind. Dazu gehören die „Ternary Complex Factors“ (TCFs) ELK1, ELK3 und ELK4, AP1-Komponenten (cFOS, FRA1), aber auch Transkriptionsfaktoren wie NFAT, STAT1 und STAT2, die Gene der Immunantwort regulieren (Chen et al. 2004, Tanoue et al. 2003).

1.3.4 JNK

Die cJUN NH₂-terminalen Kinasen (JNK) werden in drei Genen kodiert (JNK1-3) und können in zehn verschiedenen Isoformen auftreten (Minden et al. 1997). Ihre Aktivierung wird durch proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktorentzug sowie UV-Bestrahlung, aber auch durch proliferatorische Signale induziert, die zur Aktivierung verschiedener Signalwege (P38, RAC/CDC42, RAS und RHO, TGFβ) führen (Chen et al. 2001). JNK spielt eine wichtige Rolle in immunologischen Prozessen, der Organisation des Aktinskeletts, der stress- und entwicklungsbedingten Apoptose sowie der zellulären Transformation. (Wolfmann et al. 2002). JNK phosphoryliert eine Reihe verschiedener zytoplasmatischer (Bcl2, Bcl-xL) und nukleärer Proteine (Transkriptionsfaktoren: NFATc, ATF2, HSF1, cMYC, p53, STAT1,3, FOXO4, PAX2, TCFβ1, TIF1α, JUN, cFOS, nukleäre Rezeptoren: Peroxisomproliferationsaktivatorrezeptor, Glucocorticoidrezeptor, RARα, RxRα, Nur77) (Roux et al. 2004). Die konstitutive Hem-

mung von JNK-Signalwegen geht mit verstärkter Apoptose und schlechterer Immunantwort einher (Chen et al. 2004).

1.3.5 P38

P38-Isoformen (alpha, delta) werden gewebeabhängig unterschiedlich exprimiert. Die MAPK ist sehr klein und besteht zum grössten Teil aus der katalytischen Domäne. Die Phosphorylierung findet wie bei ERK und JNK am TxY-Motiv statt und kann über einen autoregulatorischen Loop fortgeführt werden. P38 kann über RAC-CDC42 und nachfolgend verschiedene MEKKs (MLK, ASK1, TAK1, TAO1) und MEKs (3, 6, 7) aktiviert werden. Die verantwortlichen Stimuli sind zellabhängig und umfassen sowohl Interleukine (IL1, 17, 18), als auch physikalischen und chemischen Stress (Oxidation, Hyperosmose, UV-Strahlung, Hypoxie, Ischemie, Reperfusion) sowie Pathogene. P38 kommt wie auch die anderen MAPK sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vor und kann entsprechende Proteine phosphorylieren. Neben Transkriptionsfaktoren (ATF1,2 cFOS, cJUN, CREB, MEF2a, SAP1, ELK1, NFkB, MAX, HS1, p53, NFkB, ETS1) phosphoryliert p38 auch untergeordnete Proteinkinasen wie MAPKAP3 (CREB, ATF1, SRF) und MNK/MSK1 (EIF4)). Die konstitutive Hemmung von p38 kann durch andere MAPK kompensiert werden und bewirkt keinen pathogenen Phänotyp (Chen et al. 2001).

1.3.5 ERK5

ERK5, auch als BMK1 bezeichnet, ist mit 100 kDA die grösste MAPK bei Säugern. Sie kann sowohl durch proliferative Signale wie Wachstumshormone und Serum, als auch durch Stresssignale aktiviert werden und somit sowohl Proliferation als auch Stressantwort vermitteln. Üblicherweise verläuft die Aktivierungskaskade über TP12, WNK1 und MEK5 (Wang et al. 2005, Xu et al. 2004). Zu den Substraten bzw. Zielgenen gehören Mef2, PPAR, SAP1alpha, cFOS, cMYC, Bad, Foxo3A, cJUN, CCND1 und SGK (Wang et al. 2006, Nishimoto et al. 2006).

1.3.6 Kinasen unterhalb der MAPK

Für p38, ERK1/2 und ERK5 sind verschiedene nachfolgende Kinasen (RSK, MSK, MK, MNK) bekannt. Die meisten dieser Kinasen sind bisher nicht genau charakterisiert worden. Lediglich für RSK sind spezifische Funktionen bekannt, da die konstitutive Hemmung von RSK in Mäusen zu verzögerter neuronaler Entwicklung sowie Defiziten in der Knochengewebisdifferenzierung führt (Hauge et al. 2006). RSK, MSK, MK und MNK phosphorylieren eine Reihe verschiedener Proteine (RSK: SRF, CREB, ER81/ETV1, ELK1, IGF1, I κ B, CCNB, H3; MSK/MNK: Zytokine, EIF4, SRF, ER81/ETV1, CREB, Gerüstproteine) (Roux et al. 2004).

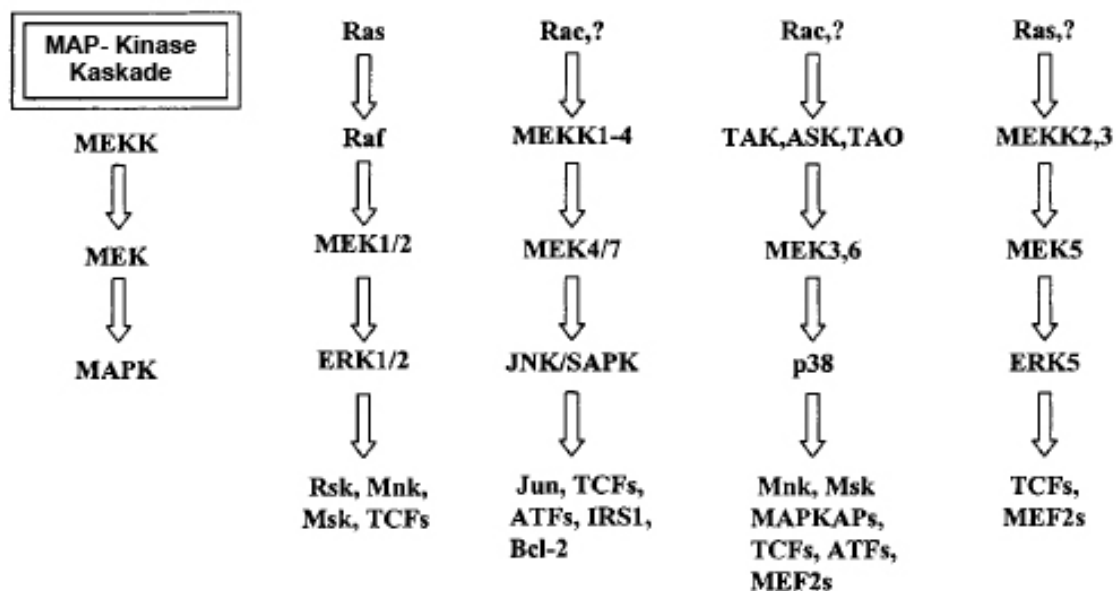


Abb. 1.3: Übersicht MAPK-Signalwege und zugehörige Module (nach Chen et al. 2001)

1.4 ERK-abhängige transkriptionelle Netzwerke

1.4.1 Allgemeines

Die von MAPK phosphorylierten Transkriptionsfaktoren unterliegen einer netzwerkartigen Hierarchie, deren Komposition von der Länge und Stärke des eingehenden Stimulus sowie der Interaktion der übergeordneten Signalwege abhängt. Dabei spielen Komplexbildungen, positive und negative Rückkopplungen, sowie die Beeinflussung der epigenetischen Strukturen eine wichtige Rolle (Yang et al. 2003, Hazza-lin et al. 2002). Man unterscheidet Gene anhand ihrer transkriptionellen Aktivierung

in „housekeeping genes“ (reizunabhängig), „immediate early genes“ (IEG) und „delayed genes“ (DG). Die IEGs werden nach Stimulierung innerhalb weniger Minuten durch die Aktivierung bereits vorhandener Transkriptionsfaktoren exprimiert und zum Teil schnell wieder abgebaut. Dazu gehören verschiedene Komponenten des AP1-Komplexes (cFOS, FOSB, FRA1, cJUN) und andere Transkriptionsfaktoren wie SRF, EGR1 und EGR2 (Cochran 1993). DGs wie STAT-Proteine hingegen werden erst nach einiger Zeit aktiviert und unterliegen normalerweise der Regulation durch Transkriptionsfaktoren aus der IEG-Gruppe.

1.4.2 SRF

SRF („Serum Response Factor“) ist einer der am besten charakterisierten Faktoren der IEGs, die von MAPK aktiviert werden (Chai et al. 2002). Er ist ein zentraler Transkriptionsfaktor bei der Steuerung proliferativer, differenzierungs- und motilitätsassoziierter Gene (Chai et al. 2002, Miano et al. 2003, Niu 2005, Parlakian et al. 2005). Die Expression von SRF spielt eine entscheidende Rolle in der Embryogenese; so sterben SRF-defiziente Mäuse bereits nach wenigen Tagen *in utero* (Chai et al. 2002).

SRF kommt in verschiedenen Spliceformen vor (68, 62, 48 kDa), deren Expressionsverhältnis gewebeabhängig ist. Die Grundstruktur besteht aus einer SRE-Bindedomäne, einer Dimerisierungsdomäne (MADS-Box), einer transaktivierenden Domäne (TAD) und Phosphorylierungsstellen (Chai et al. 2002).

Die Transkription von SRF wird über verschiedene Stimuli aktiviert. Dazu gehören Proliferationssignale (Serum, LPA, Mitogene, LPS, TPA), Stresssignale (Redoxsignale, Cytokine, TNFalpha, virale Infektion, Ca²⁺-steuernde Proteine), Onkogene (*v-src*, *v-fps*, *v-ras*, *v-raf*) und andere äussere Faktoren (Antioxidantien, UV-Strahlung, Mikrogravität). Diese bewirken eine Aktivierung verschiedener RAS- und RHO-assoziiierter Signalwege, die zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie SP1 und ELK1 führen (Kasza et al. 2005, Spencer et al. 1999). Diese binden an den SRF-Promoter. SRF kann an seinen eigenen Promoter binden und seine Transkripti-

on positiv beeinflussen. Daneben verfügt SRF über mehrere miRNA-133-Bindestellen, deren Interaktion die Translation von SRF negativ beeinflusst.

Die Aktivierung der transkriptionellen Aktivität wird über ERK-RSK vermittelt (Rivera 1993). SRF bindet an die sog. CArG-Box von Promotoren (CC[A/T]6GG) und interagiert zur Vermittlung der Transkription mit anderen Transkriptionsfaktoren. Diese umfassen neben den proliferationssteuernden Ternary Complex Factors (TCF) und den RHO-regulierten Myocardin Related Transcription Factors (MRTFs) (Posern et al. 2006, Zarimytidou et al. 2006, Selvaraj et al. 2004, Wang et al. 2004) auch Transkriptionsfaktoren des AP1-Komplexes (ATF6) und andere (SP1, GATA4), positive und negative Kofaktoren wie CREB, C/EBP, p300 (Chai et al. 2002, Hanlon et al. 2001) und histonmodifizierende Faktoren wie HATs und HDACs (Cooper et al. 2007). Das gewebe- und stimulusabhängige Verhältnis der einzelnen Faktoren zueinander sowie die Sequenz der Bindestelle und der angrenzenden Sequenzen haben entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung des Komplexes und die spezifische Regulation der Zielgene.

1.4.3 Ternary Complex Factors (TCF)

Die Ternary Complex Factors (TCF) ELK1, SAP1(ELK4), SAP2 (NET, ELK3) wurden 1995 erstmals als eigenständige, ubiquitär exprimierte Gene beschrieben, die einen Komplex mit SRF eingehen können (Giovane et al. 1995). Sie sind an der Steuerung verschiedener zellulärer Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung sowie Proliferation beteiligt (Sharrocks et al. 2002, Oikawa et al. 2003) und spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung proliferativer Signale innerhalb der Tumorgenese. So sind sie zum Teil über die Deregulierung von Mitgliedern der extrazellulären Matrix (MMP3, MMP9) für die Steuerung von verschiedenen Proteinen bei der epithelial-mesenchymalen Transition (Seth et al. 2005) verantwortlich.

Aktivierungsmechanismus

Die TCF haben 4 gemeinsame Domänen: **A**, welche die ETS-Bindestelle und das „winged Helix-Turn-Helix“-Motiv beinhaltet, **B**, welche die Interaktion mit MADS Transkriptionsfaktoren wie SRF vermittelt, **C**, in der die MAPK-Phosphorylierungsstelle und die „Transcription Activating Domain“ (TAD) liegen sowie **D**, die über das FPFX-Motiv (F) für die Bindung an MAPK verantwortlich ist (Price et al. 1995, Sharrocks et al. 2002) (**Abb. 1.4**). Darüber hinaus weisen einige TCFs spezifische Besonderheiten auf, wie die inhibitorischen Domänen von ELK3 und ELK1 (Chai et al. 2002) sowie das ELK1-spezifische R-Motiv (Seth et al. 2005). Die Organisation und Struktur der verschiedenen Domänen ist entscheidend für der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren und bei der spezifischen Bindung dieser an die DNA (Buchwalter et al. 2005).

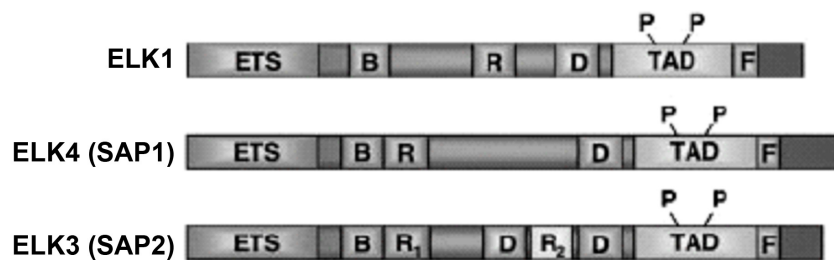


Abb. 1.4: Aufbau der TCFs (nach Sharrocks et al. 2002)

A Domäne hier mit ETS bezeichnet.

TCFs bilden mit SRF Dimere am Promoter. Sowohl die Bindung der TCFs an die ETS-Bindedomäne (EBS) als auch die Interaktion mit SRF wird über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen reguliert (Buchwalter et al. 2005, Sharrocks et al. 2002, Seth et al. 2005). Die Phosphorylierung der TCF durch ERK, p38 und JNK bzw. RSK führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren (Seth et al. 2005, Sharrocks et al. 2002). Die Phosphorylierung der TCF wird über die Serin-Threoninphosphatasen PP1A, PP2A/B/C wieder aufgehoben (Buchwalter et al. 2005). Weitere Proteinmodifikationen umfassen Ubiquitinierungen, die zum Proteinabbau führen, sowie Sumoylierungen, die das Protein stabilisieren (Buchwalter et al. 2005).

Die Interaktion mit koregulierenden Faktoren beeinflusst ebenfalls die Aktivierung der TCF. So verstärkt die Interaktion von PAX5 mit ELK1 und ELK3 (Buchwalter et al. 2005) deren Aktivierung, wohingegen die Wechselwirkung von BRCA1 und p53 bei ELK3 und Homodimeren von ELK1 die jeweilige Aktivität hemmen.

ELK3

ELK3 wurde 1994 als neuer RAS-abhängiger ETS-Transkriptionsfaktor (NET, SAP2) identifiziert (Giovane et al. 1994) und als transkriptioneller Repressor beschrieben, der durch ERK und JNK-Phosphorylierung zum Aktivator werden kann (Hill et al. 1995, Ducret et al. 2000). Dabei führt die Phosphorylierung über ERK zu einer transkriptionellen Aktivierung des Repressors, während die Phosphorylierung über JNK zur nukleären Exklusion des Proteins führt (Ducret et al. 2000). ELK3 tritt in zwei Splicingformen auf (ELK3 und ELK3-b), die unterschiedliche Aktivierungsfähigkeiten aufweisen (Giovane et al. 1997). ELK3-b kann nicht durch Phosphorylierung aktiviert werden und ist somit ein konstitutiver Repressor (Giovane et al. 1997).

Die hemmende Funktion von ELK3 wird über zwei inhibitorische Domänen, CID (common inhibitory domain) und NID (new inhibitory domain) vermittelt. Die CID vermittelt die Interaktion mit dem Repressor CtBP (Schaeper et al. 1995) und behindert so die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors (Criqui-Filipe et al. 1999, Chai et al. 2002). Die NID ist eine autonome inhibitorische Domäne (Chai et al. 2002). Sie interagiert mit Sumoylierungsproteinen wie USC9 und PIAS1 (Maira et al. 1996) und behindert ebenfalls die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors (Wasylyk et al. 2005).

ELK3 kann die Transkription von cFOS, EGR1, PAI1, CTP, NOS, HO1 und VEGFR beeinflussen und spielt bei der Hypoxie, Zellmigration, Angiogenese und Organentwicklung eine wichtige regulierende Rolle (Gross et al. 2007, Buchwalter et al. 2005). ELK3-defiziente Mäuse zeigen einen starken Defekt bei der vaskulären Entwicklung und in der Wundheilung (Buchwalter et al. 2005).

1.4.4 AP1 Komplex

AP1 (Aktivator Protein 1)

Bei AP1 handelt es sich um einen dimeren Transkriptionsfaktorkomplex, dessen Untereinheiten aus bZIP (Leucin-Zipper)- Transkriptionsfaktoren zusammengesetzt sind (Angel et al. 1991). Diese bilden Homo- oder Heterodimere aus Proteinen der JUN- (cJUN, JUND, JUNB) und FOS- (cFOS, FRA1, FRA2, FOSB) Familie (Angel et al. 1991, Verde et al. 2007, Young et al. 2006), sowie anderen Proteinen der bZIP-Familie wie MAF und ATF (Eychene et al. 2008, Chinenov et al. 2001) (**Abb. 1.4**). Der Komplex wurde bereits 1987 im Zusammenhang mit der Transkription von hMT2A beschrieben (Piette et al. 1987) und die Untereinheiten wenig später umfassend charakterisiert (Angel et al. 1991). Diese Studien führten zu der Erkenntnis, dass AP1 eine entscheidende Rolle innerhalb der Zelle wahrnimmt (Ashida et al. 2005). So konnte der Komplex mit einer Vielzahl von Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose, Stress- und Immunantwort, Zellzyklussteuerung und Differenzierung in Verbindung gebracht werden (Angel et al. 1991, Reddy et al. 2002). Damit verbunden ist die grosse Bedeutung von AP1 für die Entstehung und Progression von Tumoren in Lunge, Knochen, Brust, Kolon und Hirn (Verde et al. 2007) und der onkogenen Transformation von Zellen (Ashida et al. 2005, Young et al. 2006, Reddy et al. 2002, Ozanne et al. 2007, Eferl et al. 2003, Talotta et al. 2009). AP1/FRA1 ist in vielen Tumoren überexprimiert (Reddy et al. 2002, Verde et al. 2007) (**Tab. 1.1**) und kann abhängig von Zelltyp und Umgebung eine Hemmung der Apoptose und die phänotypische Ausbildung onkogen transformierter Zellen (mesenchymaler Phänotyp, ankerunabhängiges Wachstum, Angiogenese, Invasivität) auslösen (Reddy et al. 2002, Verde et al. 2007, Young et al. 2006).

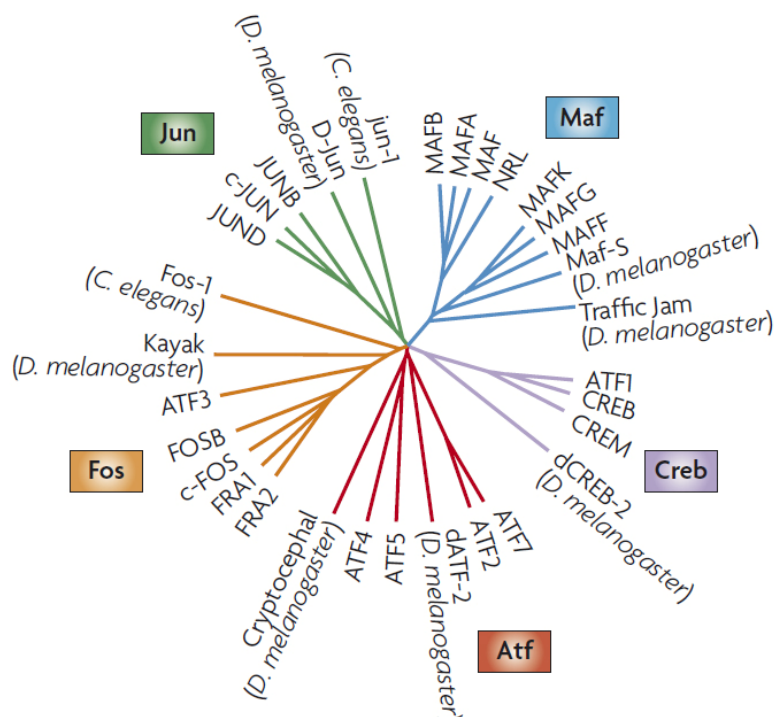


Abb. 1.4: Übersicht AP1-Komponenten der bZIP Familie (aus Eychène et al. 2008)

Tab. 1.1: FRA1 Indikationen in humanen Tumoren und Tumorzelllinien

Tumor	Eigenschaft	Quelle
Brust	-aufreguliert -Erhöhung Motilität von Brustkrebszellen	Reddy et al. 2002 Milde-Langosch et al. 2005 Kustikowa et al. 1998
Kolon	-Transformation von Epithelzellen zu Adenokarzinomem	Milde-Langosch et al. 2005 Young et al. 2006, Zhang et al. 2005, Vial et al. 2003, Pollock et al. 2005
Lunge	-häufig hoch exprimiert, Unterschiedlich in verschiedenen Zelllinien -HRAS abh. FRA1 switch sclc zu nsccl	Reddy et al. 2002 Young et al. 2006
Knochen	aufreguliert in Knochen	Reddy et al. 2002
Hirn	aufreguliert in Glioblastomen	Debinsky et al. 2001
Verdauungstrakt	Aufreguliert in Speiseröhre, Kolon, Magen	Reddy et al. 2002
Andere	Aufreguliert in Thyroid-, Nasopharyngeal-Endometrial-, Prostata-, Mesotheliom-Tumoren, Kopf-Hals-Karzinom	Verde et al. 2007, Milde-Langosch et al. 2005, Young et al. 2006, Mangone et al. 2005

Für die Untereinheiten wurden verschiedene Funktionen in der Tumorgenese gezeigt. So besitzen cJUN, FRA1 und FRA2 onkogene Funktion, währenddessen JUNB, JUND und cFOS das Tumorwachstum hemmen können (Talotta et al. 2009, Eferl et

al. 2003, Young et al. 2006, Bergers et al. 1995). Diese Funktionen sind nicht auf Mutationen zurückführbar (Verde et al. 2007, Vogt et al. 2001).

AP1-Komplex: Untereinheiten und DNA-Bindung

Die Funktionalität von AP1 wird zum grossen Teil durch seine spezifische Zusammensetzung bestimmt. Zurzeit sind 18 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten von JUN- und FOS-Proteinen bekannt (Young et al. 2006), unter anderem JUN-Homodimere. Die Zusammensetzung des AP1-Komplexes ist zelltypabhängig und wird durch die Aktivierung der übergeordneten Signalwege bestimmt.

JUN- und FOS-Proteine, sowie andere mögliche Dimerisierungspartner gehören zur Familie der bZIP Proteine. Sie zeichnen sich durch einheitliche Leucin-Zipper aus, eine Alpha-Helixstruktur, in der jede siebente Aminosäure durch ein Leucin oder eine andere hydrophobe Aminosäure besetzt ist (Angel et al. 1991). Der Leucin-Zipper vermittelt Wechselwirkungen mit Partnerstrukturen anderer Proteine und führt zur Dimerisierung der AP1-Komponenten. Ebenfalls wichtig sind die einheitlichen basalen Domänen in JUN- und FOS-Proteinen. Diese zentral gelegenen Bereiche sind für die Interaktion mit Bindemotiven auf der DNA zuständig. JUN- und FOS-Proteine weisen jeweils strukturelle Besonderheiten auf, die für ihre spezifische Dimerisierung und Aktivierung ausschlaggebend sind (Milde-Langosch et al. 2005, Basbous et al. 2007).

Die konservierte Bindedomäne für AP1-Proteine ist das „TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) Responsive Element“ (TRE) (Angel et al. 1991). Neben der Affinität der spezifischen Dimere an die TRE ist gezeigt worden, dass auch die Struktur der angrenzenden Sequenzen neben der Bindestelle einen starken Einfluss auf Bindevermögen und Orientierung des AP1-Komplexes am Promoter hat (Rajaram et al. 1997), da diese die lokale räumliche Struktur der DNA beeinflusst und so eine Bindung des Komplexes hemmt oder fördert.

Transkriptionelle AP1 -Regulierung

AP1 ist durch eine Vielzahl externer und zellzyklusabhängiger Stimuli aktivierbar (Wagner et al. 2005, Verde et al. 2007, Reddy et al. 2002). RAS-abhängig ist es dem MEK-ERK-Signalweg angeschlossen (Zuber et al. 2000, Tchernitsa et al. 2004). Dabei spielt die Dauer der übergeordneten Stimulierung für die Zusammensetzung des AP1-Komplexes eine entscheidende Rolle. Die Expression von JUN-Proteinen in unstimulierten Zellen liegt häufig über der FOS-Proteinexpression (Angel et al. 1991, Reddy et al. 2002), daher liegen vornehmlich JUN-JUN Dimere vor. Diese werden nach Stimulierung durch kurzlebige JUN-cFOS-Dimere abgelöst, um bei fortdauernden Signalen durch JUN-FRA1 Komplexe ersetzt zu werden (Reddy et al. 2002, Talotta et al. 2009).

Die Promoterstrukturen von JUN und FOS sind ähnlich. Gemein sind ihnen Bindestellen für AP1, CTF und SP1 sowie CREB und ATF (Angel et al. 1991, Reddy et al. 2002). Diese verbinden die Aktivierung der AP1-Komponenten mit MAPK-Signalwegen (ERK, JNK), aber auch RalGDS (ATF2, Yang et al. 2003) und PI3K (SP1, Reddy et al. 2002). Der FOS-Promoter unterscheidet sich von JUN durch zusätzliche Bindestellen für SRF und TCF (Elk1, SAP1, SAP2/NET/Elk3) (Angel et al. 1991, Reddy et al. 2002). FRA1 besitzt im Gegensatz zu den anderen FOS-Genen keine TATA-Box oder SRF-Bindestellen, allerdings zusätzliche AP1-Bindestellen im Promoter sowie im ersten Intron (Bergers et al. 1995, Reddy et al. 2002), SP1-Bindestellen und Bindestellen für Beta-Catenin-abhängig gesteuerte Transkriptionsfaktoren (Verde et al. 2007). Zudem wird nach der initialen Transkription über JUN-FOS-Komplexe FOS aus AP1 verdrängt und durch FRA1 selbst ersetzt (s.o.). Dies stellt eine positive Rückkopplung dar (Cohen et al. 1988, Bergers et al. 1995, Verde et al. 2007). Negative Regulatoren von AP1 sind ebenfalls bekannt. So hemmt die Bindung von SP1 und TCF bzw. cJUN-JUNB und JUN-CREB Dimeren die Transkription von JUN (Angel et al. 1991). IFN ist bekannt, die FRA1 Transkription innerhalb einer negativen Rückkopplung zu hemmen (Wagner et al. 2005).

Posttranslationale AP1-Regulierung

Die Untereinheiten des AP1-Komplexes können über verschiedene Mechanismen posttranslational beeinflusst werden. Am besten charakterisiert sind hierbei Phosphorylierungen und die Veränderung der Lokalisation. JUN-Proteine werden über JNK und FOS-Proteine über ERK phosphoryliert. Sowohl JUN als auch FOS beinhalten 5-7 Phosphorylierungsstellen (Angel et al. 1991, Reddy et al. 2002), die zur Stabilisierung der Proteine gegen Ubiquitinierung (Young et al. 2006) und zur Aktivierung der TADs beitragen (Basbous et al. 2007). Für FRA1 ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Ser252 und Ser265 entscheidend zur Stabilisierung beiträgt (Young et al. 2006, Basbous et al. 2007). Zusätzlich gibt es eine Thr231-Phosphorylierungsstelle, die zur Aktivierung einer nicht konservierten transaktivierenden Domäne an FRA1 dient (Basbous et al. 2007). Ausserdem ist für FRA1 gezeigt worden, dass die Lokalisation stressabhängig gesteuert wird (Burch et al. 2004).

Bekannte AP1 und FRA1- Zielgene

Durch verschiedene Studien konnten bereits direkte und indirekte AP1/FRA1-Zielgene identifiziert werden. Dazu gehören Gene für MMPs, Antioxidanzenzyme, Zelloberflächenproteine, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, Differenzierungsmarker, immunresponsive Gene, Zytokine, Überlebensfaktoren, miRNAs und andere Transkriptionsfaktoren (Wagner et al. 2005, Reddy et al. 2002). Eine Zusammenstellung findet sich in **Tab. 1.2**.

Tab. 1.2: bekannte Zielgene von AP1/FRA1

Eigenschaft	Beispiel	Quelle
AP1 Bindestelle	Collagenase, MT1a, S40, aP2	Angel et al. 1991
Transkriptionsfaktoren	NFAT, STAT3, JUNB	Wagner et al. 2005, Talotta et al. 2009
Immunantwort	IL2,3,5,8,15, IFN-gamma, TNF-alpha, CP4OC	Wagner et al. 2005, Angel et al. 1991, Chinenov et al. 2001
Apoptose	FasL	Wagner et al. 2005
ECM	MMP1,9,13,14, CD44	Wagner et al. 2005, Young et al.2006
miRNA	mi-21	Talotta et al. 2009
Zellzyklus	CCND1, CCNA, CCNE	Katabani et al. 2005, Casalino et al. 2003
Tumorsuppressoren	p14/p19ARF	Verde et al. 2007

2. Problemstellung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse von transkriptionellen Netzwerken, die Gene im Rahmen der RAS-ERK-abhängigen Signalübertragung ansteuern. Im speziellen wird die Umordnung der Netzwerke im Vergleich immortaler zu RAS-transformierten humanen embryonalen Nierenepithelzellen untersucht und die Funktion möglicher essentieller Faktoren genauer charakterisiert.

In **Abb. 2.1** ist das Projekt schematisch zusammengefasst. In der ersten Phase der Arbeit (**Kapitel 4.1** und **4.2**) werden RAS-ERK-abhängig regulierte Transkriptionsfaktoren über den Vergleich erstellter Expressionsprofile (Affymetrix, HG U133A) unbehandelter und U0126-behandelter immortaler und HRAS^{V12}-transformierter Zellen ermittelt und im Westernblot validiert. Der Einfluss der Hemmung der RAS-ERK-Signalkaskade auf das Proliferationsverhalten wird ebenfalls untersucht.

In der zweiten Phase (**Kapitel 4.3** und **4.4.**) wird die Funktion der Transkriptionsfaktoren SRF, FRA1 und ELK3 analysiert und mögliche Zusammenhänge bei der Regulation der Transkription untersucht. Dabei werden unter Verwendung transkriptionsfaktorspezifischer siRNAs Expressionsprofile erstellt, um anhand bioinformatischer und statistischer Methoden direkte und indirekte Zielgene der Transkriptionsfaktoren zu identifizieren. Zudem wird das Proliferationsverhalten nach Transkriptionsfaktorhemmung analysiert. Die ermittelten Zielgene werden mittels ChIP und qPCR (Taqman) validiert, diskutiert und sofern möglich in das RAS-ERK-abhängige Netzwerk integriert.

Phase I MEK/ERK Zielgene

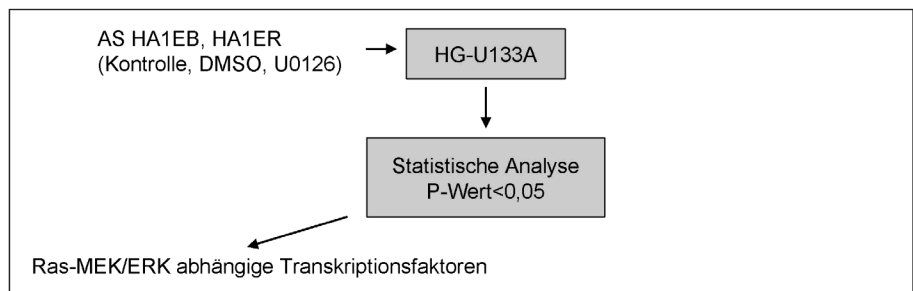
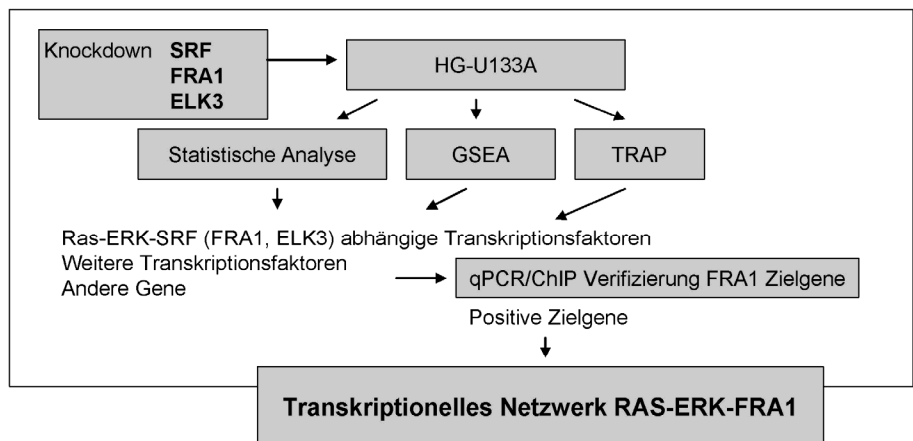
Phase II
Transkriptionelles
Netzwerk

Abb. 2.1: Schema der Arbeitsabläufe zur Bearbeitung der Problemstellung

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Material

3.1.1 Übersicht Zelllinien und Medien

Tab. 3.1: Zelllinien

Zelllinie	Typ	Medium	Herkunft
HA1EB	Humanes embryonales	MEM-alpha	<i>Prof.R.A. Weinberg</i>
HA1ER	Nierenepithel		

Tab. 3.2: Medien

Medien	Zusätze	Hersteller
MEM-alpha	10% IFS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2 mM Ultraglutamin	Sigma (M4526)
OptiMEM	10% IFS	Gibco (51985-026)

3.1.2 Transfektionsreagenzien, Inhibitoren und siRNAs

Tab. 3.3: Transfektionsreagenzien

Reagenz	Hersteller
Oligofectamin	Invitrogen
Primefect	Lonza

Tab. 3.4: verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
U0126	Promega (PRMV1121)

Tab. 3.5: Scrambled siRNAs Sequenzen SCR0-2

Name	Herkunft	siRNA	Sequenz
SCR0	Min Cam Ha-Thi	sense	AAG CGA AGC CCA TTA CCC CTT CCT GTC TC
		antisense	AAA AGG GGT AAT GGG CTT CGC CCT GTC TC
SCR1	Applied Bio- systems	sense	AGU ACU GCU UAC GAU ACG GTT
		antisense	CCG UAU CGU AAG CAG UAC UTT
SCR2	Dharmacon	Sequenzen nicht bekannt	

Nummerierung fortlaufend 0-2. SCR0 ist ein Derivat einer THBS1-spezifischen siRNA, das laborintern von Min Cam Ha-Thi zur Verfügung gestellt wurde, SCR1= *Silencer*TM-Negative control (Applied Biosystems, AM4635), Sequenzen von SCR2 (Dharmacon, ON TARGET Plus non targeting Pool, D-001810-10-05) waren nicht bekannt

Tab. 3.6: siRNAs selbst konstruiert

siRNA	Start vom ATG		Sequenz
SRF1	+1180	Sense	5'- UGAGUGCCACUGGCUUUGAtt -3'
		Antisense	3'- ttACUCACGGUGACCGAAACU -5'
SRF2	+914	Sense	5'- GAUGGAGUUCAUCGACAActt -3'
		Antisense	3'- ttCUACCUCAAGUAGCUGUUG -5'

Zum Design wurde das unter http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html verlinkte Protokoll von Ambion (Applied Biosystems) verwendet und die siRNAs mit dem silencer™-siRNA-construction-Kit (Ambion / Applied Biosystems, AM 1620) konstruiert.

Tab. 3.7: siRNAs kommerziell

siRNA	Bestellnummer	siRNA	Sequenz
HMGA2-1	289435	Sense	AAACGGCCAAGAGGCAGACTt
		Antisense	GUCUGCCUCUUGGCCGUUUtt
HMGA1-2	279256	Sense	AGACCCAAAGGCAGCAAAAtt
		Antisense	UUUUGCUGCCUUUGGGUCUtc
SRF3	142734	Sense	CCAAGAGUGAAUGAUCCGctt
		Antisense	GCGGAUCAUUCACUCUUGGtg
FRA1-1	139508	Sense	GGCCUUGUGAACAGAUCAgtt
		Antisense	CUGAUCUGUUCACAAGGCCctt
FRA1-2	42204	Sense	GUAUCCCACAUCCAACUCCctt
		Antisense	GGAGUUGGAUGUGGGAUActg
ATF3-1	241437	Sense	AAGUGCCGAAACAAGAAGAtt
		Antisense	UCUUCUUGUUUCGGCACUUtg
ATF3-2	3094	Sense	GGAUUUUGCUAACCUGACGtt
		Antisense	CGUCAGGUUAGCAAAAUCctc
ELK3-1	114511	Sense	CCUCGAACGAUGGUGAAUUtt
		Antisense	AAUUCACCAUCGUUCGAGGtc
ELK2-1	114512	Sense	CCAAUAAAACCGACAAGCAtt
		Antisense	UGCUUGUCGGUUUUUAUUGGtc
ETV1-1	115585	Sense	GCAAGGCUACGUGUAUUAAtt
		Antisense	UUAUACACGUAGCCUUCGtt
ETV1-2	115584	Sense	GGCAGUUUUAUGAUGACACtt
		Antisense	GUGUCAUCAUAAAACUGCCtg

3.1.3 Antikörper, Blockpeptide, Primer und Taqmanassays

Tab. 3.8: Blockpeptid

Peptid		
FRA1	sc-183P	lot: F1708

Tab. 3.9: verwendete fluoreszenzmarkierte Primär-Antikörper (Durchflusszytometrie)

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Firma	Label	Verdünnung
pERK	ERK1/2 (pT202/pY204)	-	BD, #612566	PE	1:2,5
SRF	SRF (G20)	anti-kaninchen Alexa488	SC, #sc-335	Alexa 488	1:75

Tab. 3.10: verwendete Primärantikörper

Name	Firma	Nr	Methode	SAK	Ansatz in
Actin	Chemicon	MAB 1501 R	WB	Maus	1:5000 1x TBST
ATF2 (N-96)	Santa Cruz	sc-6233X	WB	Kaninchen	1:400 5% MM; 0,05% NaN ₃
ATF3 (C-19)	Santa Cruz	sc-188	WB	Kaninchen	1:400 5% MM; 0,05% NaN ₃
cFOS	Santa Cruz	2250	WB	Kaninchen	1:500 5% MM; 0,05% NaN ₃
cMYC	BM	1814150	WB	Maus	1:800 5% MM
pERK (Thr202/Tyr204)	NEB	9101	WB	Kaninchen	1:1000 5% BSA
EGR1	Santa Cruz	sc-110	WB	Kaninchen	1:200 5% MM; 0,05% NaN ₃
ELK3	ATLAS	HPA001600	WB	Kaninchen	1:1000 10% MM
ETS1	Biozol / Abcam	ab26096	WB	Kaninchen	1:1000 5% MM
ETV1	Santa Cruz	sc-28681	WB	Kaninchen	1:1000 10% MM
FRA-1 (N17)	Santa Cruz	sc-183	WB, ChIP	Kaninchen	1:1000 5% MM
FRA1 (R-20)	Santa Cruz	sc-605	WB, ChIP	Kaninchen	1:1000 5% MM
H3	NEB	9715	WB	Kaninchen	1:1000 5% BSA
HMGA2	Abnova	H8091-A01	WB	Maus	1:500 10% MM
pATF2 (Thr71)	Cellsignal	9221	WB	Kaninchen	1:1000 5% BSA
pCREB (S133)	NEB	9191	WB	Kaninchen	1:1000 5% BSA
pJNK	Cellsignal	4668	WB	Kaninchen	1:1000 5% BSA
pcJun (Ser63)	NEB	9261	WB	Kaninchen	1:1000 5% BSA
pSRF (Ser103)	NEB	4261	WB	Kaninchen	1:1000 5% BSA
SRF (G-20)	Santa Cruz	sc-335	WB, FACS	Kaninchen	1:200 10% MM; 0,1% NaN ₃
pStat1 (Tyr701)	NEB	9171	WB	Rabbit	1:1000 5% BSA
STAT1	NEB	9172	WB	Rabbit	1:1000 5% BSA
TP53 (Pab240)	Santa Cruz	sc-099	WB	Mouse	1:200 5% MM; 0,05% NaN ₃

NEB: New England Biolabs, BM: Böhlinger Mannheim, WB: Westernblot, ChIP: Chromatinimmunopräzipitation, MM: Magermilch, BSA: Bovines Serum Albumin, NaN₃: Natriumazid, TBST: Tris-Buffered Saline Tween-20. BSA und MM wurden in TBST gelöst. Die Ansatzbedingungen für ChIP und FACS sind den entsprechenden Methodenteilen zu entnehmen.

Tab. 3.11: verwendete Sekundärantikörper

Name	Firma	Nr	Ansatz in
HRP- α - Kaninchen	NEB	7074	5% BSA
HRP- α -Maus	Dianova	315-035-045	5% MM
Alexa Fluor 488-rabbit	Invitrogen	A-11028	3% BSA

NEB: New England Biolabs, WB: Westernblot, ChIP: Chromatinimmunopräzipitation, MM: Magermilch, BSA: Bovines Serum Albumin, NaN₃: Natriumazid, TBST: Tris-Buffered Saline Tween-20. BSA und MM wurden in TBST gelöst.

Tab. 3.12: RT-PCR-Primer

Primer	Sequenz	T _A [°C]	Zyklenzahl
NMI	s 5'- CGG AGT TAC AAG AGG CTA C -3'	56	28
	as 5'- GGA GAA ACA GTA ACT CTA TGG -3'	56	
AKTIN	s 5'- CCT TGT CAC ACG AGC CAG TG -3'	analog	analog
	as 5'- TGC CTG TTT CCG TAG GAC TC -3'		
GAPDH	s 5'- CCA TGG CAC CGT CAA GGC TG -3'	analog	anaog
	as 5'- GCC ATG TGG GCC ATG AGG TC -3'		
RT-RAS	s 5'- TGA GGA TGG ATG ACG GAA TATA A -3'	56	28
	as 5'- GAG TCC TTC ACC CGT TTG ATG T -3'	56	
ELK3	s 5'- GGG TAT GGA GAG TGC AAT C -3'	56	30
	as 5'- GTC ATC TCC ACC GCG TG -3'	56	

Tab. 3.13: ChIP-PCRPrimer

Target	Primer		Sequenz	Position BS (ATG)	Grösse
CCND1	CCND1-1	s	CGAAAGGTCGGGACTGGT	-3761	156
		as	GCTGTGGGAACCTTCATTCA	-3748	
	CCND1-2	s	ACGTCTACACCCCAACAAA	-1052	169
		as	TTAACCGGGAGAAACACACC	-1038	
VEGFR	VEGFR2	s	AGTGGCCCATAGACCATCTG	2543	150
		as	CTCAGAAATTAAGTGGCATTGG	2555	
AEBP1	AEBP1-1	s	CCAAACTCTGCCCTGTCAAT	-1325	317
		as	AATGTTGGCTGCCCTACAAC	-1310	
	AEBP1-2	s	CTAGGGTTGGTGTGTGGTT	571	267
		as	AATGTAGGACCACCCATTGC	586	
	AEBP1-3	s	GGATGGCTCAGTCACCTCTC	1522	284
		as	GGCACAGGGACTCTTGTCAG	1533	
	FRA1-2	s	AATGCGGCGAATAGAGACCT	946	463
		as	TGTTCTGGGAGAAGTGGGTT	957	
FRA1	FRA1-3	s	GCTGAGATCGTGCCACTACA	3043	311
		as	ACAGGCTAGCTCTGGGAACA	3054	
	YWHAZ-1	s	GGAGGGATGGACTTGTGCTA	-5927	241
		as	GGCAAGACCCCTTCTCTACA	-5938	
YWHAZ	YWHAZ-2	s	TCAAATTTCTGGTGCCTACG	-4774	200
		as	TTGTTGCTTTTCACAAGTTGC	-4761	
TCFL5	TCFL5-1	s	TTGAATCCACAGACGCAGAG	-3006	226
		as	GTTGCAGTGAGCCAAGATCA	-2993	
	TCFL5-2	s	GTGGGCAGATCACCTGAAGT	-2278	191
		as	GCACGATCTTGACTCAGCAC	-2266	
	TCFL5-3	s	CTCGATCTCCTGACCTCCTG	-649	243
		as	GTGATACCTACGCGGTGACA	-638	

„Position BS (ATG)“ gibt die Position der AP1-Bindestelle im Bezug auf das Startkodon (ATG) an

Tab. 3.14: Taqmanassays (Applied Biosystems)

Zielgen	Assay ID	Zielgen	Assay ID
AEBP1	Hs00371239_m1	ISG15	Hs00192713_m1
AREB6	Hs00611024_m1	MCL1	Hs00172036_m1
CALD1	Hs00921992_m1	MYL9	Hs00382913_m1
CDC42	Hs00741586_mH	NPAS2	HS01551845_m1
CNN1	Hs00154543_m1	PAX8	Hs00247591_m1
COL6A1	Hs00242448_m1	PCGF2/MEL18	Hs00810635_g1
CXCL6	Hs00605742_g1	PSME	Hs0039209_m1
DUSP4	Hs01027785_m1	RALGDS	Hs00894285_g1
DUSP6	Hs00169257_m1	RASSF1	Hs00200394_m1
E2F1	Hs00153451_m1	SLC2A4RG	Hs00219920_m1
ECM1	Hs00189441_m1	SMARCA4	Hs00231324_m1
ECM2	Hs00946419_m1	SOX4	Hs0026838_s1
EFNA1	Hs01020895_m1	SP1	Hs00298764_s1
ELK3	Hs00987816_m1	SRF	Hs01065260_g1
ETV1	Hs00951941_m1	SRF	Hs00182371_m1
FOSL1	Hs00759776_s1	STAT3	Hs01047580_m1
FOXL1	Hs00534264_s1	TCF3	Hs01012685_m1
FOXO3A	Hs00921424_m1	TCFL5	Hs00232444_m1
HIF1A	Hs00936378_m1	TUBB3	Hs00801390_s1
HMGA1	Hs00852949_g1	WEE1	Hs01119386_gH
HMGA2	Hs00171569_m1	YWHAZ	Hs00852925_sH

3.1.4 Sonstige Chemikalien, Kits und Stammlösungen

Tab. 3.15: verwendete Kits

Name	Hersteller	Verwendung
Cell Proliferation Kit	Roche	MTT-Assay
ECL (Enhanced Chemoluminescence Analysis Kit)	Amersham	WB
Access RT-PCR System	Promega	RT-PCR
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	Taqman
<i>Silencer</i> ® siRNA Construction Kit	Ambion/Applied Biosystems	siRNA
Western blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic	WB

Tab. 3.16: verwendete Antibiotika

Antibiotika	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Calbiochem (492018)
Hygromycin B	Roche (1084355501)
Neomycin (G418)	Calbiochem (345812)
Puromycin	Sigma (P7255)
Ultraglutamin	Lonza (BE 17-605E/U1)

Tab. 3.17: Sonstige Chemikalien

Chemikalie	Firma
1kb-Leiter (für RNA-Agarosegele)	Eurogentec
Acrylamid	Roth (3029.1)
Agar Noble	B&D (214220)
Agarose	Serva (11404)
Amidoschwarz	Merck (1167)
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck (1.01201.0100)
Bromphenolblau	Sigma (115399)
BSA (Bovine Serum Albumine)	Serva (11926)
Chloroform	Sigma Aldrich (C2432)
Complete	Roche (1697498)
Coomassie Brilliantblau R250	Sigma (6104592)
DDT (Dithiotreitol)	Sigma (064416421)
DEPC (Diethylprocarbonat)	Sigma (2165428)
Desinfektionsmittel Meliseptol	Braun (650542/2)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (064K00671)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma (D43815)
Dynabeads anti rabbit-IgG	Invitrogen (112.04D)
EDTA (Titriplex)	Merck (1.08418.0250)
EGTA	Sigma (E3889)
Eisessig	Merck (561000)
Entwickler	Kodack
Ethanol	J.T. Baker (605183)
Ethidiumbromid	Sigma
FACS-Flow	B&D (342003)
FACS-Rinse	B&D (340346)
Fixierer	Kodack
Formaldehyd (37%)	JT Baker
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom (S0115)

Tab. 3.18: Fortsetzung sonstige Chemikalien

Chemikalie	Firma
Glycerin (Glycin)	Merck (1.04033.1000)
Hepes	Sigma (H3375)
Isoamylalkohol	Sigma (W205702)
Isopropanol	Baker (8045)
KCl (Kaliumchlorid)	Merck (1.04936.1000)
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck (1.04877.1000)
LiCl (Lithiumchlorid)	Sigma (L0505)
Marker (für SDS-PAGE)	PageRuler Fermentas (SM0671)
Marker SMART1kb (für DNA-Agarosegele)	Eurogentec (MW-1800-04)
Methanol	J.T. Baker (8045)
Milchpulver	Applichem (108301000)
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat)	Merck (1.06580.1000)
NaCl (Natriumchlorid)	Merck (1.06404.1000)
NaOH	Merck (1.06498.1000)
Natrium-Azetat	Merck (1.06207.0500)
Natriumdesoxycholat (DOC)	Sigma (105K2618)
Natriumjodat	Merck (65250.100)
Nonidet NP40 (10%)	Calbiochem (492018)
Pelletpaint	Novagen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (A2213)
Phenol	Fluka (77613)
Phosphataseinhibitor	Pierce
PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid)	Sigma (P7626)
Proteinase K	Roche (03115887001)
Q Solution	Qiagen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva (20765)
Taqman Mastermix	Applied Biosystems (4367659)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma (19281-26ML)
Trireagent	Invitrogen (15596-026)
Tris Base	Merck (1.08382.2500)
Tris HCl	Merck (1.08259.1000)
TritonX100	Sigma (9002-93-1)
Trizol	Invitrogen
Trypsin/EDTA (für Zellkultur)	Biochrom AG (L2153)
Tween20	Serva (37470)

Tab. 3.19: Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Amidoschwarz (400 ml):	Amidoschwarz 0,4g Methanol 90ml Eisessig 20ml bi-destilliertes Wasser 290ml
10% APS:	1g APS in 10ml bi-destilliertem Wasser lösen
2,5x Blotpuffer (1 l):	Tris-Base 14,5g Glycerin 7,3g 10% SDS 9,37ml Methanol 500ml Auf 1l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen

Tab. 3.20: Fortsetzung Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Complete (50x):	1 Tablette in 1 ml bi-destilliertem Wasser lösen
Coomassie-Färbelösung (500 ml)	Coomassie 0,25g Methanol 250ml Eisessig 50ml bi-destilliertes Wasser 200ml
Destain (1 l):	Methanol 400ml Eisessig 100ml bi-destilliertes Wasser 500ml
0,1% DEPC (100 ml):	900µl DEPC in bi-destilliertes Wasser geben Deckel nur anschrauben und über Nacht stehen lassen, autoklavieren und Deckel fest verschrauben
0,5M EDTA (1 l):	EDTA 186,1g bi-destilliertes Wasser 800ml NaOH-Plättchen 20g pH 8 einstellen Auf 1l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
5x Elektrophoresepuffer (1 l):	Tris-Base 15,1g Glycin 72,0g SDS 5,0g Auf 1l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen, pH 8,3
Elution (500 ml)	Ethanol 250ml EDTA (0,5M) 50µl NaOH (0,5M) 25ml bi-destilliertes Wasser 225ml
Entwickler (1 l):	Destilliertes Wasser 700ml Lösung A 250ml Lösung B 25ml Lösung C 25ml
Fixierer (1 l):	Destilliertes Wasser 700ml Lösung A 250ml Lösung B 50ml
3M Natrium-Acetat (1 l)	408,1g Natrium-Acetat in 800ml bi-destilliertem Wasser lösen pH 5,5 mit Essigsäure einstellen Auf 1l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
10x PBS (1l)	NaCl 80g KCl 2g Na ₂ HPO ₄ 14,4g KH ₂ PO ₄ 2,4g Auf 1l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen, pH 7,4
2x Probenpuffer (10 ml):	0,5M Tris Base pH 6,8 2ml DDT 0,308g 10% SDS 4ml Glycerin 2ml Bromphenolblau 0,1g Auf 10ml mit bi-destilliertem Wasser auffüllen

Tab. 3.21: Fortsetzung Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer (50 ml)	1M HEPES, pH 8,0 2,5 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 100 µl 10% NP40 5 ml 10% DOC 3,5 ml 8 M LiCl 3,125 ml 1 Tablette Roche complete Auf 50ml mit bi-distilliertem Wasser auffüllen
Elutionspuffer (50 ml)	1 M Tris, pH 8,0 500 µl 0,5 M EDTA 100 ml 10% SDS 5 ml Auf 50ml mit bi-distilliertem Wasser auffüllen
50x TAE (1 l):	Tris Base 242g EDTA 18,6g Auf 1l mit bi-distilliertem Wasser auffüllen, pH 8,0
5x TBS (1 l):	1M Tris-Base, pH 8,0 50ml 5M NaCl 150ml bi-distilliertes Wasser 800ml
0,05% TBST (1 l)	TBS 1l Tween20 500µl

3.1.5 Software, Geräte und Verbrauchsmaterial

Tab. 3.22: Verwendete Software

Anwendung	Software (Hersteller)
Bildanalyse und -bearbeitung	Adobe Photoshop CS Version 9.0 (Adobe)
Geldokumentation	Argus 4.1.0 (Biostep)
Zellbilder	DC Viewer (Leica) Leica IM50 Image Manager (Leica)
Durchflusszytometrie	CellQuest Pro 5.2 (BD)
ELISA-Reader	Microplate Manager 5.2.1 (Biorad)
statistische Analyse	Microsoft Office (Access, Excel)

Tab. 3.23: Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
10cm Petrischalen	BD Falcon
0,5ml, 1,5ml und 2ml Eppendorf-Tubes	Eppendorf
15ml, 50ml Falcon-Tubes	BD Falcon
4-Well-Platten	Quadriperm Vivascience
6-Well-Platten	BD Falcon
96-Well-Platten	BD Falcon
96-Rundwell-Platten	BD Falcon
Blotgerät	PreQLab
Brutschrank Zellkultur	Hera
Elektrophoresekammer + Zubehör	Biorad

Tab. 3.24: Fortsetzung Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
ELISA-Reader	Biorad
Durchflusszytometer	BD FACS Calibus
Filme (Röntgenfilme)	Amersham Hyperfilm
Fluoreszenzmikroskop	Zeis Axiophot
Hamilton-Pipette	Hamilton
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf
Kryobox	Nalgene
Kryoröhrchen	Cellstar
Kulturflaschen für Zellkultur	BD Falcon
Küvette (für RNS-Messung)	Hellma
Magnetrührer	IKAMAG
Mikroskop (Zelle)	Leica DMIL
Mikrowellenofen	Samsung
Nitrozellulosemembranen	Protran N Schleicher & Schüll (10401396)
Objektträger	R. Langenbrinck
PCR-Cycler	Eppendorf
Photometer	Pharmacia Biotech
Schüttler	Stuart Scientific
Spannungsgerät	Biorad
Real Time PCR 96well Platten	Applied Biosystems (4360954)
Real Time PCR cover Plates	Applied Biosystems (4346906)
UV-Gerät inkl. Kamera	Biostep
Vortex	Assistant
Wärmeschrank	Heraeus
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL 1092
Zellschaber	TPP
Zentrifugen	Allegra X-15R, Avanti™ J25, Optima™-TL (Beckmann Coulter) 5417R, 5415C (Eppendorff)

3.2 Verwendete Zellen und Zellkultur

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in den humanen Nierenepithelzelllinien HA1EB und HA1ER (Hahn et al. 1999, Counter et al. 1998, Stewart et al. 1991) durchgeführt. Diese wurden durch stabile Transfektion von hTERT (**Tab. 3.1**) (Counter et al. 1998) immortalisiert. Stabil transfizierte SV40-Early Region (Stewart et al. 1991) (**Tab. 3.25**) unterdrückt die zelluläre Seneszens durch die Inhibierung von p53 und pRB assoziierten Signalwegen (Serrano et al. 1997) der Aktivitätshemmung von PP2A (Hahn et al. 2002). Zusätzlich wurde ein pBabe-Puro-basierender Vektor (Serrano et al. 1997) in die Zellen eingebracht, in HA1EB als Leervektor, in HA1ER mit onkogenem HRAS^{v12} (**Tab. 3.25**). Alle drei Vektoren unterliegen einer eigenen Antibiotikakontrolle (**Tab. 3.25**), das dem Kulturmedium (MEM alpha supplementiert mit

10% IFS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2 mM Ultraglutamin) zugesetzt wird. Die Zellen wurden aus dem Labor von Robert A. Weinberg bezogen.

Tab. 3.25: Übersicht transfizierter Vektoren und Eigenschaften

Eigenschaft	Vektor	Resistenz und Konzentration
hTERT	pBABE-hygro-hTERT	Hygromycin 0,1 mg/ml
SV40-ER	pSV3-neo	Neomycin/G418 0,4 mg/ml
HRAS V12	pBABE-puro-ras-V12	Puromycin 0,5 µg/ml

Die Zellen wurden 2-3-mal pro Woche und maximal 10-12x kontinuierlich vereinzelt und unter dem Mikroskop morphologisch geprüft. Das Ablösen der Zellen erfolgte nach Mediumentzug mit 3 ml Trypsin pro T75-Flasche. Das Peptidasegemisch zersetzt Serinbindungen in Proteinen und führt nach kurzer Zeit (5 min) zum Ablösen adhärenter Zellen. Nach Abstoppen der Reaktion mit 4 ml Medium wurde die Zellsuspension für 5 min bei 149 xg zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen und 1 ml neu eingesät. Für Experimente wurden 1500 Zellen (96wells), $5 \cdot 10^4$ (6wells) und $1 \cdot 10^5$ Zellen (10cm Schalen) verwendet.

Die Archivierung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Nach dem Trypsinieren und der Zentrifugation wurden die Zellen mit 2 ml Medium (10% DMSO (v/v)) versetzt. Diese wurden auf zwei Kryoröhrchen aufgeteilt und zunächst bei -80 °C eingefroren und später in Stickstoff überführt. Die Abkühlungsrate bei -80 °C betrug ca. -1 K/h. Zur Vermeidung von Umkristallisationsprozessen wurde das Auftauen unter ständiger Bewegung bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach anschliessendem tropfenweisem Zugabe von 5 ml Medium, um das zytotoxische DMSO zu verdünnen wurden die Zellen 5 min bei 149 xg zentrifugiert, das Zellpellet in 15 ml Medium aufgenommen und in T75-Zellkulturflaschen überführt.

3.3 MEK/ERK-Signalweghemmung und Hemmung der Zielgene

3.3.1 MEK/ERK-Signalweghemmung

Zur Identifizierung MEK/ERK-abhängiger Zielgene wurden die Zellen mit 10 μM U0126 für 48 h und 96 h behandelt (**Tab. 3.4**). Dieser Inhibitor hemmt die Kinaseaktivität von MEK1/2 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* und verhindert die weitere Signaltransduktion (Gould et al. 1999, Duncia et al. 1998). U0126 wird in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Da aber DMSO das Zellwachstum über Veränderungen des Zytoskeletts stark beeinflussen kann (Carvalho et al. 1989), wurden bei den Experimenten neben unbehandelten Kontrollen auch DMSO-behandelte Kontrollen mitgeführt.

3.3.2 siRNA-Experimente

Prinzip

Die RNA-Interferenz ist ein natürlicher Mechanismus zur Inhibierung individueller Genexpression in eukaryontischen Zellen (Rahman et al. 2008, Juliano et al. 2008, Elbashir et al. 2001). Verantwortlich hierfür ist die Interaktion von mRNA mit kurzsträngigen (21-23 nt) komplementären RNAs (Elbashir et al. 2001). Man unterscheidet siRNA (small interfering RNA), piRNA (PIWI interacting RNA) und miRNA (micro RNA) (Matranga et al. 2008, Juliano et al. 2008, Pushparaj et al. 2008), deren Wirkmechanismus auf exakter Übereinstimmung der komplementären RNAs (piRNA, siRNA) oder Fehlpaarungen in einzelnen Basen (miRNA) (Matranga et al. 2008) basiert.

Transfiziert man Zellen mit künstlichen siRNAs, so werden diese in den Zellen dem RISC (RNA interference silencing complex) zugeführt. Das enthaltende AGO2 (Argonaute Protein 2) bindet den antisense-Strang der siRNA (Matranga et al. 2008), der als „Führer“ zum Finden komplementärer Sequenzen auf mRNAs verwendet wird (Meister et al. 2004). Diese wird ebenfalls durch RISC gebunden und spezifisch geschnitten, (Juliano et al. 2008, Matranga et al. 2008), was zum Abbau führt. In der vorliegenden Arbeit wurden kommerzielle und selbst-designte siRNAs nach den Vorgaben von Ambion (jetzt ABI) verwandt (**Tab. 3.5 bis Tab. 3.7**). Diese unterliegen den Regeln nach Tuschl (Tuschl et al. 2001).

Lipophile Transfektion von Zellen

Zum Transfer von siRNA kommen verschiedene Methoden in Frage: Elektroporation, Beschuss mit Nanopartikeln, Peptidkopplung oder Transfer mittels lipophiler Agenzien (LA). Für die transiente Transfektion von HA1EB und HA1ER wurden die LAs Oligofektamin (#12252011, Invitrogen) und Primefect (#PA-3269, Lonza) verwendet. Diese werden von der Zelle über Endozytose (Juliano et al. 2008) aufgenommen.

Transfektion mit Oligofektamin

Für die durchgeführten Experimente wurden 5×10^4 – 8×10^4 Zellen/Well ausgesät und zweifach im Abstand von 24 h mit siRNA transfiziert. Um Serumreste abzuspülen erfolgte zweimaliges Waschen der Zellen mit 1x PBS, bevor sie mit 800 µl serumfreiem Optimum (Invitrogen) versetzt wurden. Der Transfektionsansatz beinhaltete eine Konzentration der siRNA von 50 nM in 1,5 ml Endvolumen: 7,5 µl siRNA (Stock = 10 pmol/µl) wurden in 177,5 µl Optimum verdünnt. 3 µl Oligofektamin, verdünnt in 12 µl Optimum wurden zugegeben und moderat gemischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und vorsichtig mit dem Medium vermischt. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit siRNA für 4 h bei 37 °C und 5% CO₂. Anschliessend wurden pro Well 30% IFS (Inaktives Fötale Serum) in Optimum zugeführt, so dass die Serumskonzentration bei 10% in 1,5 ml lag. Dieses Protokoll wurde zur Erhöhung der Transfektionseffizienz nach 24 h wiederholt.

Transfektion mit Primefect

Das Protokoll für die Transfektion mit Primefect stimmt zum grössten Teil mit dem für Oligofektamin überein. Unterschiedlich ist lediglich die Menge eingesetzter Transfektionsreagenz (2,5 µl/well) und die Inkubationszeit des Transfektionsansatzes (15 min).

3.4 Präparationen

3.4.1 DNA

Zur Isolierung von DNA wurden Zellen aus der Routinekultivierung nach der Trypsinierung zentrifugiert (5 min, 50 xg, RT) und bei -20 °C für eine spätere Aufarbeitung eingefro-

ren. Zur DNA-Extraktion wurden die Zellpellets in 500 µl 1xTE aufgenommen und mit Proteinase K (100 µg/µl) bei 50 °C über Nacht inkubiert. Das Lysat wurde mit 500 µl Phenol (pH 8) gemischt und bei 17640 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Danach erfolgte eine Extraktion aus der oberen Phase mittels 300 µl Phenol (pH 8)/Chloroform (1:1). Um die DNA zu präzipitieren wurde die obere wässrige Phase mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetatlösung und 1 ml Isopropanol gemischt und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 17.640 xg, 4 °C für 10 min und zweimaliges Waschen der pelletierten DNA mit je 1 ml 75% Ethanol. Abschliessend wurde die DNA für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl Nukleasese-freiem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte am Nanodrop (Implen) bei 260 nm.

3.4.2 RNA

Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach einem angepassten Protokoll des Herstellers Invitrogen mittels Trizol. Hierzu wurden die Zellen zunächst zweimal mit 1x PBS (1,8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l K₂HPO₄) gespült und anschliessend in Trizol (500 µl/Well einer 6-Wellplatte) abgekratzt. Die Proben wurden nun entweder bei -80 °C gelagert oder direkt weiterbearbeitet. Zur Aufreinigung wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit Chloroform im Verhältnis 5:1 versetzt, für 15 s gevortext und erneut 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Trennung durch Zentrifugation (10.600 xg, 15 min) wurde die obere Phase in ein neues Röhrchen überführt, mit 1 Vol Isopropanol, 2 µl Pelletpaint und 0,1 Vol 3 M Natriumacetat versetzt und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Durch Zentrifugation bei 18.000 xg für 10 min wurde die RNA pelletiert. Anschliessend erfolgte zweimaliges Waschen mit 75% Ethanol, 10 min Trocknen bei Raumtemperatur und die abschliessende Aufnahme in RNasefreiem Wasser und Lösen bei 56 °C für 10 min. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die Messung der RNA-Konzentration wurde am Nanodrop bei 260 nm durchgeführt.

3.4.3 Proteinextraktion-Gesamtzelllysate

Zur Herstellung von SDS-Gesamtzelllysaten wurden die Zellen in den Kulturschalen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit einer adäquaten Menge SDS-Lysepuffer

(1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA pH 8) versetzt, abgeschabt und in 1,5 ml Eppendorftubes überführt. Diese wurden bei 90 °C für 10 min zur Denaturierung der Proteine inkubiert. Da die DNA bei der Lyse im verwendeten Puffer sedimentiert, wurden die Proben anschliessend 5 min bei 18.000 xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

3.4.4 Proteinextraktion-Fraktionierung

Für einige Versuche war es notwendig, Proteinfractionen aus Zellkompartimenten (Kern, Membran, Zytoplasma) zu gewinnen. Dafür wurden die Zellen in den Kulturschalen 2x mit 1x PBS gewaschen und in 0,5-2 ml Hypolysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1x Proteinaseinhibitorkomplex (Roche), 1 mM PMSF, 1x Phosphataseinhibitoren (Amersham)) aufgenommen. Die Zellen wurden mit Gummischabern abgeschabt und auf Eis inkubiert. Eine kontinuierliche mikroskopische Kontrolle garantierte die optimale Lyse der Zellen bei gleichzeitigem Erhalt der Kerne. Für HA1EB und HA1ER betrug die Inkubationszeit 9-11 min. Nach Zentrifugation (1600 xg) wurde das Zellkernpellet in 2x SSB (SDS-Samplebuffer: 0,1 M Tris-HCl pH 6,8, 30,44 µg/µl DTT, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,5 µg/µl Bromphenolblau) aufgenommen, für 10 min gelöst und mit 1x PBS auf 1x SSB verdünnt. Der membran- und zytoplasmahaltige Überstand wurde für die Ultrazentrifugation (Optima TL Ultrazentrifuge) auf 3 g/Röhrchen eingestellt und bei 100.000 xg für 30 min bei 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25-100 µl 2x SSB aufgenommen und für 30 min auf Eis lysiert und danach mit 1x PBS auf 1x SSB verdünnt. Der Überstand aus der Ultrazentrifugation wurde im Verhältnis 2:4:1:3 mit Methanol, Chloroform und Aqua dest. versetzt und zum Präzipitieren der Zytoplasmaproteine 15 min bei 15.000 xg zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde verworfen und die Interphase und die organische Phase mit 6 ml Methanol gemischt. Die erneute Zentrifugation (Bedingungen s.o.) pelletierte die Zytoplasmafraktion der Proteine. Das Pellet wurde für 30 min auf Eis in 2x SSB lysiert danach auf 1x SSB verdünnt. Alle Fraktionen wurden für 10 min bei 90 °C denaturiert, 5 min bei 18.000 xg zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Tube bei -20 °C eingefroren.

3.4.5 Amidoschwarzmessung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit Amidoschwarz, einem sauren Diazofarbstoff, der unspezifisch kovalent an basische Aminosäuren bindet. Zur Messung wurden je 2 µl BSA-Lösungsstandard (0-5 µg/µl) und Probenlösung auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert und mit 0,1% Amidoschwarzlösung (0,1% (m/v) Amidoschwarz, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Ethanol) für ca. 1 min bei RT inkubiert. Überschüssige Amidoschwarzlösung wurde dekantiert bzw. durch 2 x 10 min Waschen mit Destain (90% (v/v) Methanol, 2% (v/v) Essigsäure) wieder entfernt. Die verbleibenden gefärbten Proteinpunkte wurden ausgeschnitten und in 300 µl Elutionspuffer (50% Ethanol, 50 µM EDTA, 250 µM NaOH) inkubiert. Dabei geht der Farbstoff in Lösung über. Die Messung erfolgte bei 625 nm im Biorad-Benchmark Plus-Plattenreader.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 PCR, RT-PCR und Taqman

Um individuelle Genexpression und DNA-Sequenzen nachzuweisen wurden verschiedene Amplifikationsmethoden verwendet. Allen gemein ist die zyklische Anreicherung des spezifischen Produkts über Denaturierung (94-95 °C), Primerannealing (53-60 °C) und Elongation (60-72 °C). Bei dem Nachweis von RNA wird diese zunächst in cDNA umgeschrieben. In der RT-PCR war dies als erster Schritt eingeschlossen, für den Nachweis per Taqman wurde im Vorfeld eine bestimmte Menge an cDNA aus RNA mit Hilfe des High-capacity-cDNA-Reverse-Transcription-Kits von Applied Biosystems umgeschrieben. In den Tabellen **Tab. 3.26.** bis **Tab. 3.30** sind die verwendeten Ansätze, sowie die PCR-Protokolle zusammengefasst.

Tab. 3.26: Pipettierschema PCR

Komponente	Stock	1x Ansatz	finale Konzentration
Wasser	-	-	-
PCR Puffer	10x	2,5 µl	1x
Q-Solution	10x	2,5 µl	1x
MgCl ₂	25 mM	2 µl	1 mM
dNTPs	10 mM	0,5 µl	0,2 mM
Primer	10 pM	2x1 µl	0,4 pM
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,5 µl	0,1U/µl
DNA-Template	-	20-200 ng	-
		25 µl	

Tab. 3.27: Pipettierschema RT-PCR

Komponente	Stock	1x Ansatz	finale Konzentration
Wasser	-	-	-
AMVRT 5x Puffer	5x	10 µl	1x
dNTPs	10 mM	1 µl	0,2 mM
Primer	10 pM	2x5 µl	1 pM
MgSO ₄	25 mM	2 µl	1 mM
AMV-RT	5 u/µl	1 µl	0,1 u/µl
Tfl DNA polymerase	5 u/µl	1 µl	0,1 µl
RNA-template	1-50 ng	-	
		50 µl	

Tab. 3.28: Pipettierschema RT-Taqman

Komponente	Stock	1x Ansatz	Finale Konzentration
Wasser	-	-	-
10x RT-Puffer	10x	2 µl	2x
25x dNTP Mix (100mM)	25x	0,8 µl	2x
10x RT Random Primer	10x	2 µl	2x
Multiscribe RT	50 U/µl	1 µl	5 U/µl
RNase Inhibitor	20x	1 µl	2x
		10 µl	

Der Ansatz wird mit der umzuschreibenden RNA 1:1 gemischt und der PCR zugeführt.

Tab. 3.29: Pipettierschema Taqman

Komponente	Stock	1x Ansatz	finale Konzentration
Wasser	-	-	-
Taqman Gene expression Assay	20x	0,5 µl	1x
cDNA template	-	5 µl	50 ng
Taqman Gene expression Master Mix	2x	5 µl	1x
		10,5 µl	

Tab. 3.30: PCR-Protokolle

Anwendung	Schritt		Temperatur	Zeit	Zyklen
PCR	1	Denaturierung	95 °C	5 min	1
	2	Denaturierung	95 °C	30 s	28-40
		Annealing	53-60 °C	30 s	
		Elongation	72 °C	1 min	
	3	finale Elongation	72 °C	5 min	1
RT-PCR	4	Ende	4 °C	∞	1
	1	Reverse Transkription	45 °C	45 min	1
	2	AMVRT Inaktivierung / Denaturierung	94 °C	2 min	1
	3	Denaturierung	94 °C	30 s	28-35
		Annealing	54-60 °C	1 min	
		Elongation	68 °C	2 min	
	4	finale Elongation	68 °C	7 min	
	5	Ende	4 °C	∞	1

Tab. 3.31: Fortsetzung PCR-Protokolle

Anwendung	Schritt		Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Trans-Kription	1	Annealing	25 °C	10 min	1
	2	reverse Transkription	37 °C	120 min	1
	3	Hitzeterminierung	85 °C	5 s	1
	4	Ende	4 °C	∞	1
Taqman	1	Denaturierung	95 °C	10 min	1
	2	Denaturierung	95 °C	15 s	40
		Annealing / Elongation	60 °C	1 min	
	3	Ende	4 °C	∞	1

Der Nachweis erfolgt nach Auftrennung des Amplifikationsgemisches mittels Ethidiumbromid, das mit der DNA interkaliert und über UV-Strahlung detektierbar ist. Photos der Gele wurden mit dem Felix-Geldokumentationssystem und der ArgusX1-Geldokumentationssoftware 4.1 der Firma Biostep aufgenommen.

Bei dem quantitativen Nachweis über Taqmansonden (Lee et al. 1993) wird das PCR-Primerpaar mit einer fluoreszenzgekoppelten Sonde kombiniert, die durch Licht definierter Wellenlänge (z.B. 488 nm) angeregt werden kann. Die Sonde besteht aus einem kurzen Sequenzabschnitt, der zwischen den beiden Primern bindet und an den Enden an einem Reporter (5', Fluoreszinderivat) und einem Quencher (3', Rhodamin-derivat) gekoppelt ist (Tab. 3.32). Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher unterdrückt das Fluoreszenzsignal der Sonde über den sog. Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET). Bei der Elongation der Primer wird die Sonde über die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase geschnitten. So ist die räumliche Nähe von Reporter und Quencher unterbrochen und der Reporter kann nach Lichtanregung ein Fluoreszenzsignal aussenden, das proportional zur Amplifikationsrate und Ausgangsmenge der cDNA ist. Um Messfehler durch die Detektion unspezifischer Fluoreszenzsignale zu vermeiden, wird zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff (ROX) in das System gegeben, der durch ein konstantes Signal die probenabhängige Hintergrundstrahlung bestimmbar macht. Diese wird zur Normalisierung der Messwerte herangezogen.

Tab. 3.32: Verwendete Fluoreszenzkombination

Farbstoff	chemische Bezeichnung	Typ	Anregung [nm]	Emission [nm]
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	Reporter	488	518
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin	Quencher	488	582
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin	Konstant	488	602

Für die PCR wurde eine Kombination von Assays potentiell regulierter Gene und einem Assay für das nichtregulierte Gen TUBB3 eingesetzt. Die Messwerte für TUBB3 wurden als Kontrolle herangezogen. Die verwendeten Assays und Kontrollen sind in Tab. 3.14 zusammengefasst. Zur Durchführung der qPCRs wurde das StepONE™-Realtime-PCR-system mit der Software ABI-StepONE™-V2 verwendet.

Die Analyse der Messwerte erfolgte über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hier wurden zunächst durch Differenz der C_t s für das zu testende Gen und die interne Kontrolle die Messwerte standardisiert. Aus dem so ermittelten ΔC_t -Wert wurde $2^{-\Delta C_t}$ berechnet, der in nächster Näherung der Konzentration des Amplifikats entspricht und daher für die Quantifizierung der Amplifikation geeignet ist (Schild 1998). Zur Normierung der behandelten Proben können die $2^{-\Delta C_t}$ -Werte als Ratio $2^{-\Delta\Delta C_t}$ über die Kontrollen dargestellt werden.

3.5.2 Microarrayanalyse

Hybridisierung und Standardisierung

Für die Expressionsprofilerstellung wurden biologische Duplikate verwendet. Die Qualität der RNA wurde mit dem LabChip Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) analysiert und cDNA aus 5 µg RNA umgeschrieben. Es folgte die Synthese von Biotin-markierter cRNA mit Hilfe des BioArray High Yield RNA Transcription Kits (Enzo Diagnostics, Farimigdale, NY, USA). Die Hybridisierung der cRNA auf HG U133A arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) wurde für 16 h bei 45 °C durchgeführt. Nach Waschen und Färben der Arrays (GeneChip Fluidics-Station-Protokoll EukGE-WS2) wurden diese 2x gescannt (Agilent G2500A GeneArray Scanner, Steuerung: Microarray Suite 5.0 Software (Affymetrix)) und die Rohwerte über Kalibrierung und Varianzstabilisierung nach Huber et al. 2002 ermittelt. Zur Normalisierung wurden unbehandelte Kontrollen bzw. BLIND-Kontrollen herangezogen. Die Zusammenfassung der einzelnen Annotationsintensitäten geschah unter Verwendung der „Median Polish method“ (Tukey et al. 1977). Differentiell exprimierte Gene wurden unter Gebrauch von lmFit und eBayes (StandardEinstellung) der Limma Bioconductor Pakete ermittelt. Die P-Werte wurden nach Benjamini-Hochberg eingestellt. Für alle Berechnungen und statistischen Analysen wurde die Statistiksprache R Version 2.7.1 (I-

haka et al. 1991) und Bioconductor Pakete (Gentleman et al. 2004) verwendet. Die Probenhybridisierung und Arraymessung fand im Labor für Funktionelle Genomforschung (LFGC) der Charité Berlin statt. Die statistische Analyse wurde im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin durch Christine Steinhoff durchgeführt.

Zielgenermittlung mittels P-Werten und Expressionsunterschieden

Zur Ermittlung regulierter Zielgene wurden die AffyIDs anhand ihres statistischen P-Wertes sortiert und selektiert. Dabei wurde ein P-Wert von 0,05 angelegt. Zusätzlich wurden die IDs nach dem Expressionsunterschied zur jeweiligen Kontrolle sortiert. Im Folgenden wurden Gene analysiert, die einen deutlichen Expressionsunterschied zwischen Kontrolle und Behandlung aufwiesen. Als Grenzwert wurde in der ersten Phase ein Ratio von >2 verwendet, da sich diese bei vorangegangenen Analysen bewährt hatte. Für die zweite Phase wurde ein Ratio von $>1,5$ als Grenzwert verwendet.

GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)

Bei der GSEA handelt es sich um eine literaturbasierte bioinformatische Methode (Subramanian et al. 2005). Es kann untersucht werden, ob sich Gruppen von Genen aus sortierten Listen in bereits veröffentlichten Gengruppen angereichert wiederfinden lassen. Je höher der Anreicherungsfaktor, desto grösser ist die Übereinstimmung der eigenen Listen mit bereits veröffentlichten Daten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine GSEA-basierte GO-Analyse (Gene Ontology) für die Expressionsprofile der siRNA-Experimente durchgeführt. Dabei wurden die Gene nach oben beschriebenem Schema untersucht und zusätzlich einer GO-Analyse unterzogen, um die Funktion der angereicherten Gengruppen definieren zu können. Als statistischer Grenzwert wurde hierfür ebenfalls ein P-Wert sowie ein FDR-Wert $< 0,05$ angelegt. Die Arbeiten wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin durch Ewa Szczurek durchgeführt.

TRAP (Transcription Factor Affinity Prediction)

Unter TRAP versteht man eine sequenzbasierte Untersuchungsmethode für Genlisten (Manke et al. 2008). Hier werden vorliegende DNA-Sequenzen mit Matrizen möglicher Bindesequenzen von Transkriptionsfaktoren verglichen. Der Vergleich liefert Wahrscheinlichkeiten für Transkriptionsfaktorbindestellen in DNA-Sequenzen. In den hier durchge-

fürten Analysen wurde ein Bereich von -3000 bp bis +3000 bp vom ATG auf SRF-, FRA1- und ELK3-Bindestellen untersucht, jedoch bei Bedarf erweitert. Die Arbeiten wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin durch Szymon Kielbasa durchgeführt.

GO Analyse (Gene Ontology)

Für verschiedene genauere Untersuchungen der Microarraydaten wurden GO-Analysen (Gene Ontology) durchgeführt. Hiermit können Anreicherungen molekularer Funktionalitäten („Molecular Function“, MF), zellulärer Lokalisation („Cellular Component“, CC) und die Einbettung in biologische Prozesse („Biological Process“, BP) für die Elemente von Genlisten abgeschätzt werden. Die Daten wurden mit dem frei zugänglichen Online-Annotationswerkzeug DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) bearbeitet. Für Clusteranwendungen wurde mit höchster Präzisionsstufe (highest) gearbeitet, um den Hintergrund zu minimieren.

3.5.3 Proteine

SDS-PAGE und Westernblot

Die SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamid Gel Elektrophorese) mit anschließendem Westernblot ist eine der geläufigsten Methoden zur Trennung und Analyse von Proteingemischen. Bei den hier vorgenommenen Analysen wurde das jeweilige Gemisch über eine denaturierende (SDS), diskontinuierliche (Sammel- und Trenngel) Gelelektrophorese aufgetrennt und anschliessend durch Anlegen eines senkrecht dazu stehenden elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf der danach die Immundetektion durchgeführt wurde. In **Tab. 3.33** ist eine Aufstellung der verwendeten Konzentrationen und Zusammensetzungen dargestellt.

Tab. 3.33: Zusammensetzung Polyacrylamidgele

Komponente	Stock	Endkonzentration	Sammelgel 4%	Trenngel 12.5%
Wasser	-	-	3 ml	3,3 ml
PA/nMBA	30%	-	0,66 ml	4 ml
Puffer	4x	1x	1,25 ml	2,5 ml
SDS	10%	0,10%	50 µl	100 µl
APS	10%	0,05%	25 µl	50 µl
TEMED	100%	0,10%	5 µl	10 µl

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), anionisches Detergenz zum Überlagern der Eigenladung von Proteinen. TEMED (N,N,N',N'-tetraethylethylendiamid) vernetzt Polyacrylamid / N',N'-Methylen-Bisacrylamid-gemisch (PA/nMBA) durch exotherme Reaktion über Ammoniumsulfat (APS)

Die Übertragung des Proteingemischs auf die Membran wurde unter Semi-Dry-Bedingungen bei 2 mA/cm² für 1-1,5 h durchgeführt. Nach dem Blotten erfolgte eine Färbung des Gels mit Coomassie (1 h, Raumtemperatur) mit anschliessender Entfärbung bei 4 °C in 40% Methanol/10% Essigsäure-Lösung (über Nacht) um die Güte des Transfers zu beurteilen. Die Membranen wurden 1 h bei Raumtemperatur mit 5-10% Magermilch in 1x TBST vorgeblockt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen und anschliessend entsprechend der spezifischen Bedingungen für die Proteinnachweise mit dem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert (**Tab. 3.10** und **Tab. 3.11**). Die Detektion erfolgte mittels ECL (Enhanced Chemoluminescence Analysis Kit, Amersham) durch Luminolreaktion, die durch die an den Sekundärantikörper-gebundene Meerrettichperoxidase katalysiert wird und durch einen photoempfindlichen Film nachgewiesen werden kann.

Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung einzelner Proteine wurde Durchflusszytometrie angewandt. Dies ist eine Methode zur Einzelzellanalyse, die es erlaubt, Gruppen in Zellpopulationen anhand ihrer Eigenschaften zu bestimmen und quantitativ zu erfassen. Sie umfasst die Unterscheidung von Zellpopulationen nach Grösse und Struktur (Granularität) sowie die Detektion von Oberflächen- oder intrazellulären Markern. Bei den vorliegenden Experimenten wurde ein FACScalibur-Gerät von BD verwendet und die Signale mit der Software CellQuestPro verarbeitet.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dazu wurde das Medium entzogen und die Zellen mit vorgewärmtem Trypsin abgelöst. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml 1x PBS überführt, mit 1 ml vorgewärmtem Paraformaldehyd (in 1x PBS, 20%) gemischt und für 12-15 min bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit Färbepufferpuffer (1% BSA in 1x PBS) gewaschen, in 100 µl 1x PBS aufgenommen, tropfenweise mit 900 µl kaltem Methanol versetzt und abschliessend 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation und zweimaliges Waschen mit 1 x PBS. Zur Antikörperbehandlung wurde das Zellpellet in 50 µl Stainingpuffer aufgenommen und mit dem Antikörper (**Tab. 3.9**) inkubiert. Handelte es sich wie bei pERK um einen markierten Primärantikörper, betrug die Inkubation 75 min bei RT im Dunkeln, bei einem konventionellen Primärantikörper

tikörper konnte die Inkubation im Hellen durchgeführt werden. Der entsprechende Sekundärantikörper wurde unter Beibehaltung des Volumens nach Abzentrifugation und Waschen der Zellen für 30 min im Dunkeln durchgeführt. Danach wurde das Zellpellet nochmals zweimal mit kaltem Stainingpuffer gewaschen (200 µl), abschliessend in 500 µl Stainingpuffer aufgenommen, in ein vorgekühltes FACS-Röhrchen überführt und unter Verwendung der in **Tab.3.34** zusammengestellten Parameter gemessen.

Tab. 3.34: Messparameter für die Durchflusszytometrie

Antigen	Parameter	FCS	SSC	FL1	FL2	Kompensation
pERK	Spannung	E-1	373	-	307	-
	Stromstärke	5,08	1	-	1.0	
	Aufzeichnung	Linear	Linear	-	Logarithmisch	
SRF	Spannung	E-1	354	346	-	FL2-32,6% FL1
	Stromstärke	5,08	1	1	-	
	Aufzeichnung	Linear	Linear	Logarithmisch	-	

Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid

Um den Gehalt an DNA zu bestimmen und eine Aussage über die Verteilung der Zellzyklusphasen zu erhalten ist es möglich, die Zellen nach der Fixierung mit Propidiumjodid zu behandeln. Dies ist ein DNA-interkalierender Stoff, der in FL2 im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Für die Messung wurden die Zellen analog der Antikörperbehandlung vorbereitet und mit 0,2µg/µl Propidiumjodid versetzt.

3.5.4 Protein-DNA Interaktionen

ChIP (Chromatinimmunopräzipitation)

Die ChIP ist eine Methode zur Untersuchung direkter DNA-Protein-Interaktionen. Ähnlich wie bei der CoIP werden hier Komplexe mit geeigneten Antikörpern präzipitiert. Grundlegend für die Methode ist die Eigenschaft organischer Lösungsmittel wie Formaldehyd, kovalente, hitzereversible Bindungen mit Nukleinsäuren einzugehen (crosslinken) (Solomon et al. 1985). Der Nachweis der Komplexkomponenten erfolgt über PCR, qPCR und Westernblot.

Zur Durchführung einer erfolgreichen ChromatinIP müssen verschiedene Parameter optimiert werden, die sich nach Zelllinie und zu präzipitierendem Komplex unterscheiden. Dazu gehören die Formaldehydinkubation (Zeit, Temperatur), die DNA-Scherrate, Antikörper (qualitative Überprüfung, Spezifität), Präzipitationsbedingungen (Inputmenge, Zeiten, Temperatur, Material), Hintergrundreduzierung vor und nach der Präzipitation sowie die Wahl eines geeigneten Nachweises. Nach der Optimierung wurde folgendes Protokoll verwendet:

600 µl der in der Präzipitation verwendeten magnetischen Beads (anti-Kaninchen-IgG, Invitrogen 112.0) wurden für 5 min bei 2000 xg und 5x mit je 1 ml 0,5% BSA in 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Resuspension in 1ml 0,5% BSA in 1x PBS und Zugabe des Antikörpers ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) mit anschliessender Rotation über Nacht bei 4 °C.

Pro 10 cm-Zellkulturschale wurden ca. 3×10^6 Zellen durch Zugabe von Formaldehyd ($c = 1\%$) vernetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Glycinzugabe (0,125 M finale Konzentration) gestoppt, gefolgt von 5 min sanften Schüttelns bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gespült, mit 500 µl Puffer L1 (50 mM HEPES, pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 10% Glycerin; 0,5% NP40; 0,25% TritonX100) versetzt, in 1,5 ml Eppendorff-tubes gekratzt und auf 1×10^6 Zellen/Probe eingestellt. Die L1-versetzten Proben wurden 10 min bei 4 °C rotiert und bei 956 xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 400 µl L2 (200 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1 mM EGTA, pH 8,0; 10 mM TRIS, pH 8,0) versetzt und nach oben genannten Bedingungen inkubiert und zentrifugiert. Durch die Inkubation mit den Puffern L1 und L2 wird eine zweiteilige Hypolyse der Zellen herbeigeführt, an deren Ende die nukleäre Fraktion in den Proben angereichert ist. Für die anschliessende Sonifizierung wurde das Pellet in 300 µl L3 (1 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 mM EGTA, pH 8,0; 10 mM TRIS, pH 8,0) aufgenommen und für 8-10 min im Eisbad des vorgekühlten Bioruptors von Diagenode (Einstellungen: Intervall- 0,5; Stufe- H) im Eisbad sonifiziert. Die DNA wird dabei durch Kavitation gesichert und erreicht eine Länge von 200 bp (10 min) bis 500 bp (8 min). Um grössere Fragmente abzutrennen, werden die Proben anschliessend bei 4 °C mit 20817 xg für 10 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Tube überführt und mit Glycerin versetzt (finale Konzentration: 10%). Um den Hintergrund zu reduzieren

wurden pro 300 µl Probe 33,3 µl unbeladene, vorgeblockte Beads für eine Stunde bei 4 °C und langsamer Rotation zugegeben. Danach wurde zum Abschätzen der Präzipitation ein 25 µl-Aliquot der jeweiligen Proben als „PreIP“-Probe abgenommen und zunächst bei -20 °C eingefroren. Der andere Teil der Proben wurde durch Zugabe von TritonX100 (1%), DOC (0,1%), Proteinase Inhibitor Komplex (ROCHE, 1 x), 10 xTE (1 x), sowie antikörpergekoppelten und unbeladenen Beads (1:10 v/v) für die IP vorbereitet. Die Präzipitation wurde über Nacht bei 4 °C und sanfter Rotation durchgeführt. Nach magnetischer Sedimentation der Beads wurden diese sieben Mal mit RIPA-Puffer gespült (Hepes 50 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH 8; NP40 1%; DOC 0,7%; LiCl 0,5 M; Proteinaseinhibitor Clomplex (ROCHE 1x), in 1x TE (10mM TrisHCl pH8, 1mM EDTA pH8) aufgenommen und in ein neues Tube überführt. Eventuelle Pufferreste wurden durch Zentrifugation bei 956 xg für 3 min abgetrennt und abpipettiert. Dann wurde den Proben 50 µl Elutionspuffer (Tris pH 8; 10 mM; EDTA 1 mM; SDS 1%) zugesetzt, die Proben gevortext und für 10 min bei 65 °C unter wiederholtem Vortexen alle 2 min inkubiert, um die Bindung zwischen dem IP-Komplex und den Beads aufzulösen. Für die Analyse der Präzipitation im Westernblot wurden an diesem Punkt pro Probe 5 µl Aliquots entnommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Beads wurden durch Zentrifugation (18347 xg, 30 sec) abgeschieden und der Überstand als PostIP-Proben in ein neues Tube überführt. PreIP- und PostIP-Proben wurden mit Elutionspuffer auf ein Volumen von 170 µl eingestellt und für 16 h bei 65 °C auf dem Schüttler inkubiert, um die kovalenten Bindungen zwischen DNA und Proteinen aufzulösen. Die DNA wurde danach durch Behandlung mit Proteinase K (0,115 µg/µl) für eine Stunde bei 37 °C und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) -Extraktion aufgereinigt. Um die Phasen voneinander zu trennen wurde 5 min bei 12.000 xg zentrifugiert. Die DNA-haltige obere, wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt und mit 2 Volumen 100% Ethanol unter Zugabe von Natriumazetat (0,25 M) und 2µl Pelletpaint (Novagen) für 30 min bei -20 °C gefällt. Die Proben wurden anschliessend für 15-30 min bei 4 °C und 20817 xg zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 75% Ethanol und anschliessender Zentrifugation für 5 min bei 20817 xg gewaschen. Abschliessend wurde die DNA in 20-100 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und am Nanodrop-Photometer (Implen) bei 260 nm gemessen.

3.5.5 Wachstumsassays

MTT

Im MTT-Assay kann das Proliferationsverhalten von Zellen über die stoffwechselabhängige Umsetzung von gelbem MTT-Farbstoff in violette, unlösliche Formazan quantitativ erfasst werden. Die Reaktion wird durch die Kofaktoren NADPH und NADH katalysiert, deren Menge und damit Umsatzrate des Substrats ein Indikator für die Lebensfähigkeit von Zellen ist. In den Experimenten wurden die Zellen in 6wells transfiziert (**Kapitel 3.2.2**) und anschliessend in 96-wells umgesetzt (1500 Zellen/well, 100 µl Kulturmedium). Nach 24 h wurden die Zellen mit 10 µl MTT „Labeling Reagenz“ (MTT-1) versetzt und 4 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, in denen die Umsetzung von MTT in Formazan stattfindet. Um die Reaktion abzustoppen und die entstandenen Formazankristalle zu lösen, wurden 100 µl einer entsprechenden Lösung (MTT-2) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Messung erfolgte bei 580 nm mit einer Referenz bei 700 nm.

Softagarassay

Um die Effektivität der siRNA-Experimente auf tumorrelevante Eigenschaften wie anker-unabhängiges Wachstum zu messen, wurden Softagarexperimente durchgeführt. Dafür wurde ein 0,7% Noble Agar (Difco, #014201) Stock angesetzt, der nach Aufkochen und Koagulation zunächst autoklaviert wurde und unter sterilen Bedingungen weiterverwendet werden konnte. Für die Einzelexperimente wurden die Zellen zunächst transfiziert, 24 h nach der zweiten Transfektion abtrypsinisiert und in 1 ml 1x PBS aufgenommen. Der Agar wurde im 45 °C Wasserbad peptisiert und bei 37 °C flüssig gehalten. 1x10⁵ Zellen wurden in 10 ml 2x Medium eingesät und 1:1 mit dem vorgewärmten Agar homogen gemischt. Die Suspension wurde in T25-Kulturflaschen umgefüllt und für 30 min in Eis gestellt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ für 14-21 Tage, in denen sich die Kolonien bilden konnten.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von HA1EB und HA1ER

In dem hier dargestellten Projekt wurde mit den Zelllinien HA1EB und HA1ER gearbeitet. Da diese im Vorfeld über einen längeren Zeitraum unter suboptimalen Bedingungen kultiviert wurden, war eine erneute Anpassung der Parameter vorzunehmen und das Archiv neu anzulegen. Dazu wurden die frühesten vorhandenen Zellpassagen (HA1EB Passage 2, HA1ER Passage 3) unter optimalen Bedingungen kultiviert, vermehrt und eingefroren. Zusätzlich wurde der Phänotyp hinsichtlich bestimmter Eigenschaften wie folgt untersucht.

4.1.1 Untersuchung morphologischer Merkmale

Die aus der gemeinsamen Vorläuferzelllinie HA1 bzw. HA1E (Hahn et al. 1999, Rangarajam et al. 2004) generierten Zelllinien HA1EB und HA1ER sind sich morphologisch sehr ähnlich (**Abb. 4.1**). Sie wachsen in der Zellkultur adherent in epithelähnlichen Strukturen (polygonale Zellen), zeigen jedoch aufgrund ihrer langgestreckten, spitz-zulaufenden Zellenden auch Ähnlichkeiten mit Fibroblasten. Die Transfektion mit SV40-ER führt zu typischer Vakuolenbildung. Unterscheidbar sind die Zellen durch die in den HRAS^{V12}-transfizierten HA1ER- Zellen deutlich aufgeworfenen Zellränder. Zudem können die HA1ER-Zellen bei vollständiger Konfluenz übereinanderwachsen.

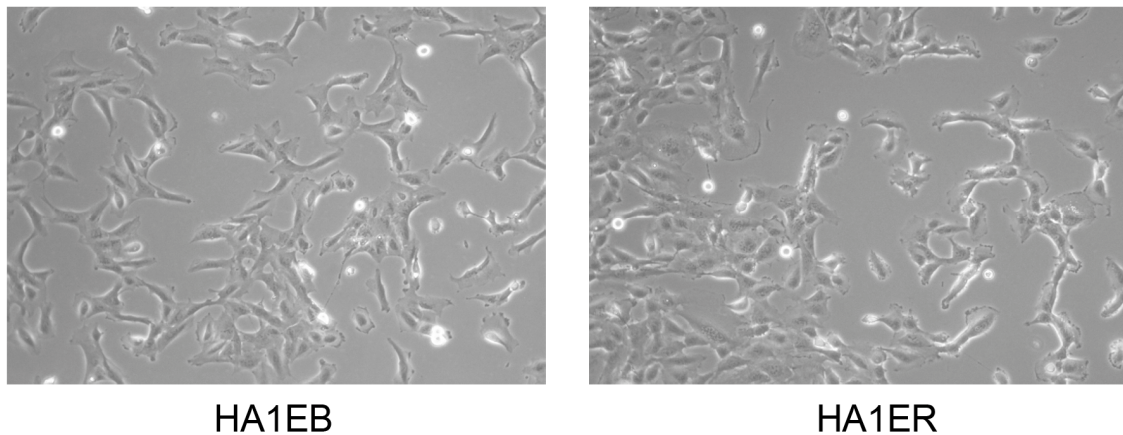
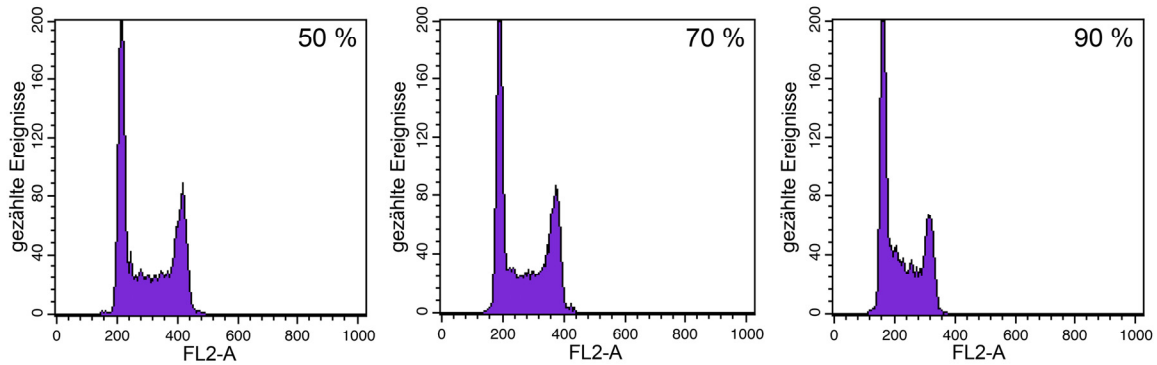
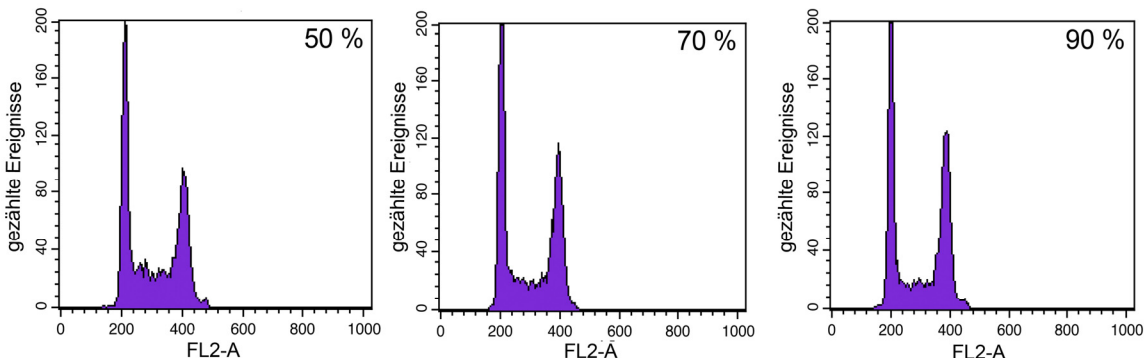


Abb. 4.1: Morphologie HA1EB und HA1ER

3×10^5 Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät und 48h nach Aussaat in 100x Vergrößerung photographiert.

4.1.2 Zellzyklus und Ploidie

Verschiedene Publikationen weisen nach, dass die Zellen bis zur 60ten Passage zum grössten Teil diploid sind (Hahn et al. 1999, Hahn et al. 2002, Zimonjic et al. 2001). Da aber auch andere Beobachtungen vorliegen (Stindl 2002, unpubliziert), wurde eine Analyse mit Propidiumjodid vorgenommen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.2** dargestellt. Hier sieht man deutlich die enge Verwandtschaft der beiden Zelllinien, deren Ploidieverhalten sich trotz onkogener HRAS-Mutation kaum voneinander unterscheidet. Beide Zelllinien zeigen eine Gleichverteilung der G0/G1-Phase und mit etwas breiterer Streuung der G2/M-Phase. In beiden Zelllinien kommt es zu minimaler Ausprägung von Polyploidie, wie in HA1EB bei 70% und HA1ER bei 50% Konfluenz am Peak neben dem G2/M-Peak zu sehen ist. Dieses Ergebnis stimmt mit vorhergehenden Publikationen überein (Hahn et al. 1999, Hahn et al. 2002). Es kann allerdings kein allgemeingültiger Schluss über das Ploidieverhalten gezogen werden, da der Vergleich mit normalen Zellen fehlt.

A HA1EB**B HA1ER****Abb. 4.2: Zellzyklusanalyse von HA1EB und HA1ER**

Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid (0,2µg/µl.), getestete Konfluenzen 50%, 70%, 90%.

4.1.3 Aktivierung der MEK-/ERK-Kaskade

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Minh Cam Ha-Thi, Ulf Krapfenbauer) haben bestätigt, dass es aufgrund der HRAS-Transformation zu einer konstitutiven Aktivierung des RAS-abhängigen Netzwerks in HA1ER-Zellen kommt. Dabei wurde eine starke Aktivierung der MEK-/ERK-Signalkaskade durch onkogenes HRAS festgestellt. Dies konnte im Zuge der Kontrollexperimente nach der erneuten Rekultivierung der beiden Zelllinien ebenfalls nachgewiesen werden (**Abb. 4.3**).

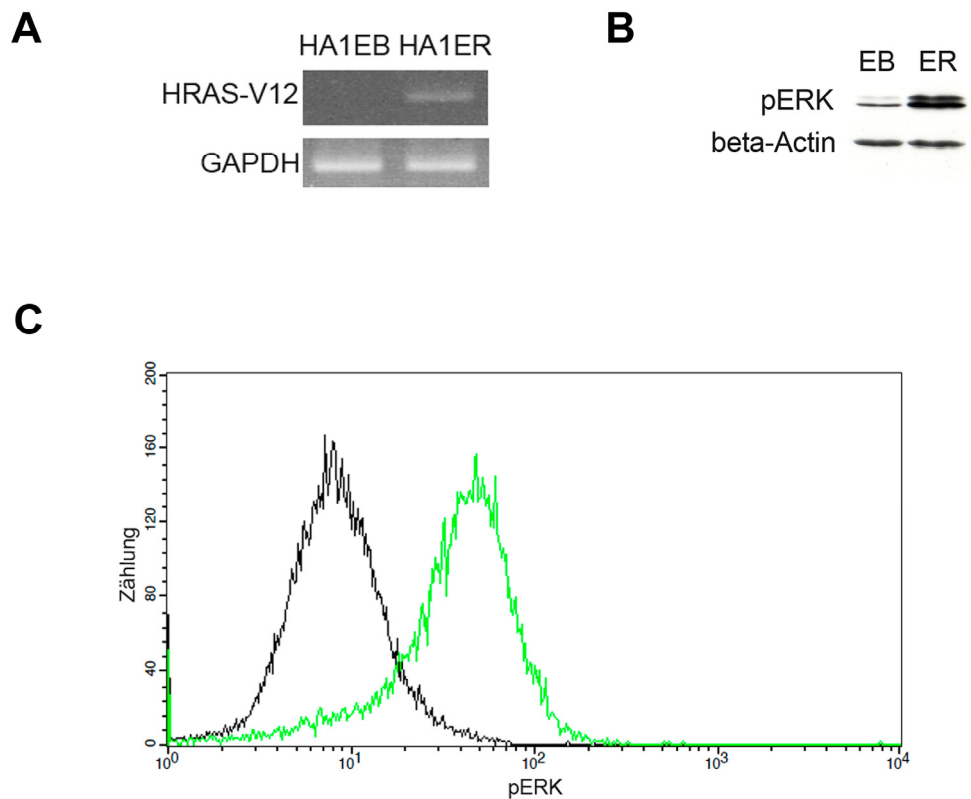


Abb. 4.3: Aktivierung der Ras-MEK/ERK-Kaskade in HA1EB und HA1ER

A Spezifische RT-PCR mit 100 ng RNA für mutiertes HRAS^{V12} im Vergleich immortaler HA1EB zu HRAS^{V12}-transformierter HA1ER; Ladekontrolle-GAPDH. **B** Vergleich der Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade über pERK-Nachweis im Westernblot in HA1EB und HA1ER mit 20 µg Gesamtzelllysate; Ladekontrolle-beta-Aktin **C** Vergleich des pERK-Niveaus in HA1EB und HA1ER mittels Durchflusszytometrie mit jeweils 10.000 Zellen; Schwarz-HA1EB, grün-HA1ER

4.1.4 Wachstumsassays

In den ursprünglichen Veröffentlichungen zu den Zelllinien wurden auch vergleichende Wachstumsassays durchgeführt, die hier zur Überprüfung der Zellen zum Teil wiederholt wurden. Dazu gehörten Überprüfungen des Wachstums in normaler Zellkultur (**Abb. 4.4**).

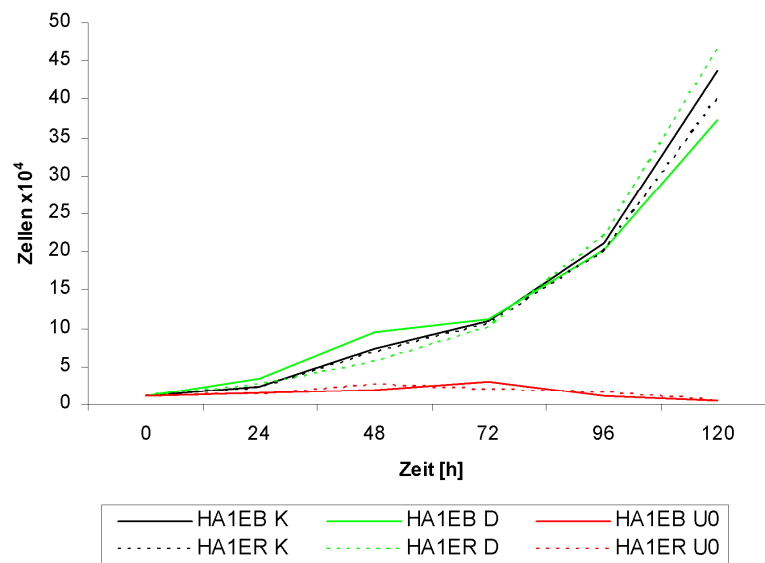


Abb. 4.4: Wachstumsverlauf HA1EB und HA1ER

Es wurden 1×10^4 Zellen in 6wells eingesät, über Nacht anwachsen lassen und mit $10 \mu\text{M}$ U0126 bzw. DMSO behandelt. Die darauf folgende Zellzählung erfolgte alle 24 h.

Aus der **Abb. 4.4** ist zu schließen, dass beide Zelllinien sehr ähnliche Wachstumsverläufe zeigen mit einer ungefähren Verdopplungsrate alle 24 h. Das entspricht den bereits veröffentlichten Verläufen von Hahn et al. 1999. Interessant ist hier, dass U0126 offenbar einen recht starken Einfluss auf das Zellwachstum zeigt. Das stimmt mit Beobachtungen aus verschiedenen Experimenten überein, bei denen Proteine isoliert wurden. Die Proteinproben der U0126-behandelten Zellen zeigten dabei immer eine wesentlich geringere Konzentration.

4.2 MEK/ERK-abhängig gesteuerte Zielgene in HA1EB und HA1ER

Zur Aufklärung des RAS-vermittelten MEK/ERK-abhängigen transkriptionellen Netzwerks wurden Expressionsprofile von unbehandelten sowie DMSO und U0126 ($10 \mu\text{M}$) behandelten Zellen erstellt. Zusätzlich wurden bereits vorhandene Expressionsprofile (Per Lund 2004) in die Analyse einbezogen. Differentiell exprimierte Zielgene wurden zum Teil im Westernblot validiert. Dabei wurden auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen analysiert.

4.2.1 Microarrayanalyse

Datenprozessierung

Die angewandten Methoden zur Datenprozessierung sind im Kapitel 3.4.2 beschrieben. Zur Bestimmung der Qualität der zu vergleichenden Proben (**Tab. 4.1**) wurde eine Korrespondenzanalyse unter Verwendung aller verfügbaren Daten durchgeführt (Christine Steinhoff, Max Planck Institut für Molekulare Genetik). Hier konnte gezeigt werden, dass die innerhalb des Projektes generierten experimentellen Daten (AS, 2006) gut mit den 2004 bereits erzeugten Datensätzen (CS) korrespondieren (Daten nicht gezeigt).

Nach der Normalisierung auf die unbehandelten Kontrollen wurde eine P-Wert-Generierung durchgeführt, in die alle Expressionsprofile einfließen (**Tab. 4.1**). Zur qualitativen Bewertung wurde ein Grenzwert (P-Wert) von $<0,05$ gesetzt. Wie in **Abb. 4.6 A** und **C** dargestellt, ist für die meisten IDs kein Unterschied in der Expression zwischen unbehandelten (DMSO) und behandelten (U0126) Zellen zu sehen. In HA1ER fallen ca. 716 IDs unter den Grenzwert. In HA1EB sind es 0; es werden also keine Gene signifikant durch U0126 in den immortalen Zellen reguliert.

Tab. 4.1: analysierte Datensets

Probe	Behandlung [h]	Probe	Behandlung [h]
CS HEK K1	96	AS HEK DMSO2	48
CS HEK K2	96	AS HEKRAS DMSO1	96
CS HEKRAS K1	96	AS HEKRAS DMSO2	96
CS HE RAS K2	96	AS HEK U0126-1	48
CS HEK Aza1	96	AS HEK U0126-2	48
CS HEK Aza2	96	AS HEKRAS U0126-1	48
CS HEKRAS Aza1	96	AS HEKRAS U0126-2	48
CS HEKRAS Aza2	96	AS HEKRAS U0126-3	96
AS HEK DMSO1	48	AS HEKRAS U0126-4	96

CS- im Labor vorhandene Daten 2004, **AS-** neu generierte Daten 2006. HEK-HA1EB, HEKRAS-HA1ER. K-Kontrolle, AZA-5'AZA-Deoxyzytidin. 1,2-biologische Wiederholungen

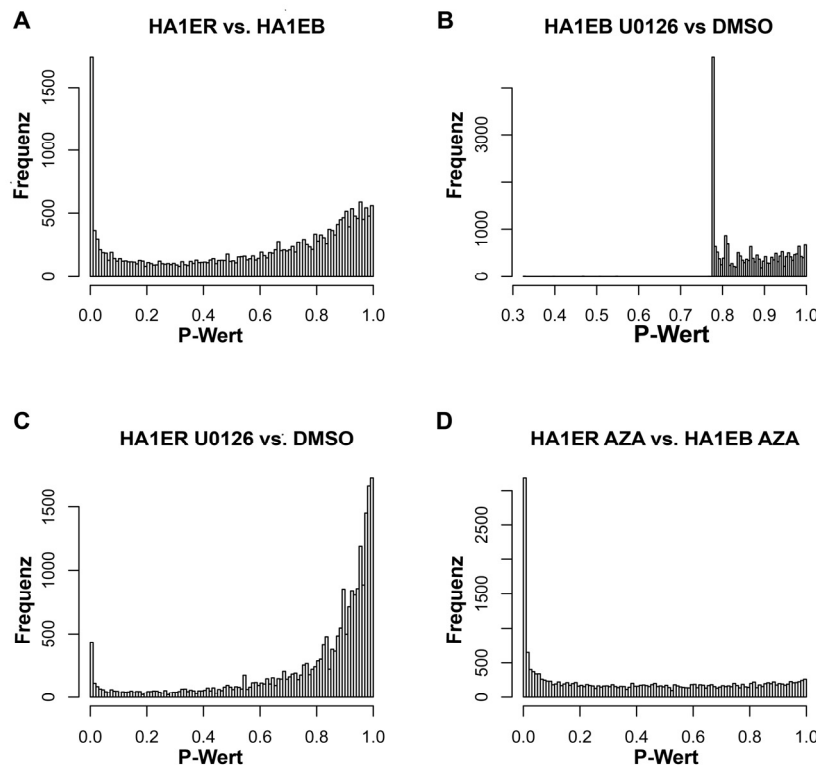


Abb. 4.5: Graphische Darstellung der P-Werts (nach Christine Steinhoff)
Dargestellt ist die Frequenz des Auftretens von P-Werten über den P-Wert

Statistische Analyse

Auf der Basis des oben beschriebenen P-Wertes war es möglich, potentiell regulierte Zielgene der MEK/ERK-Signalkaskade zu identifizieren. Die so definierten 716 IDs (658 Gene) wurden hinsichtlich ihres Expressionsniveaus untersucht. Dazu wurden verschiedene Ratios gebildet (Anhang **Tab. I**). HA1ER vs. HA1EB (Anhang **Tab. I** „HA1ER“) und HA1ER U0126 vs HA1ER DMSO (Anhang **Tab. I** „HA1ER U0126 48 h/96 h“). Expressionsänderungen um den Faktor > 2 wurden als signifikant angesehen. Die Analyse der Daten ergab eine ungefähre Gleichverteilung HRAS-abhängig auf- (451) und abregulierter IDs (310). Ein Teil dieser war durch U0126 beeinflussbar (aufreguliert: 138, herabreguliert: 103). Die so definierten, HRAS-MEK/ERK-abhängig gesteuerten, potentiellen Zielgene wurden weiteren Analysen unterzogen.

GO-Analyse: Transkriptionsassoziierte Zielgene

Zur Erweiterung des H-RAS-abhängigen transkriptionellen Netzwerks unterhalb von ERK war es notwendig, aus den regulierten Genen transkriptionsassoziierte Faktoren zu filtern. Dazu wurde eine GO-Analyse durchgeführt und die Datensets nach „transcription factor activity“, „transcriptional activator activity“ und „transcriptional repressor activity“ durchsucht. Diese Annotationen überlappen nur zum Teil, da einige Gene nicht direkt als Transkriptionsfaktoren in GO annotiert sind. Die Ergebnisse sind im Anhang in den Tabellen **Tab. II** zusammengefasst. Von den 761 IDs konnten 28 der Gruppe „transcription factor activity“ (GO1) zugeordnet werden und 10 der Gruppe „transcription activator activity“ (GO2). GO1 überlappt mit GO2 in vier Genen (FOSL1/FRA1, HMGA1, RFX5, TCF8). Die Gruppe „transcription repression activity“ (GO3) beinhaltet 13 IDs und überlappt mit GO1 in 5 Genen (ATF3, BHLHB2, ELK3, TCF8, TRIM22). Unter Berücksichtigung der Expressionsunterschiede (> Faktor 2 zur Kontrolle) kann eine Gruppe potentiell regulierter Transkriptionsfaktoren definiert werden (**Tab. 4.2**). Diese wurden weiter analysiert. In die Analyse wurden zusätzlich Gene einbezogen, die geringere Expressionsunterschiede zeigten, aber als Bindepartner oder Familienmitglieder bestimmter regulierter Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen (**Tab. 4.3**).

Tab. 4.2: signifikant RAS-abhängig regulierte Zielgene

	AffyID	SYMBOL	P-Wert		HA1ER	Ratio	
			HA1ER	U0		U0 48h	U0 96h
A aufreguliert	208025_s_at	HMGA2	1,62618E-14	1,8049E-05	11,43	0,16	0,16
	221911_at	ETV1	7,2756E-15	0,000253	3,07	0,20	0,20
	221773_at	ELK3	1,6262E-14	0,000499	4,24	0,37	0,46
	204420_at	FOSL1	1,9255E-15	0,025490	2,56	0,31	0,37
B abreguliert	202672_s_at	ATF3	3,5917E-19	2,1649E-09	0,270	2,401	2,200
	209969_s_at	STAT1	7,2756E-15	0,001573	0,106	2,778	0,968

Dargestellt sind diejenigen Gene, die RAS-abhängig im Vergleich HA1ER zu HA1EB reguliert werden (**A** und **B**) und eine signifikante Expressionsänderung nach U0126-Behandlung zeigen. P-Werte und Ratios: „HA1ER“ entspricht HA1ER vs. HA1EB; „U0“ entspricht HA1ER U0126 vs. HA1ER DMSO; U0 48/96-HA1ER mit 48 bzw. 96 h Inkubation 10 µM U0126.

Tab. 4.3: weitere Zielgene

	AffyID	SYMBOL	P-Wert		Ratio		
			HA1ER	HA1ER U0	HA1ER	U0 48h	U0 96h
A	201989_s_at	CREBL2	1,925E-15	0,003	2,436	0,634	0,881
	203964_at	NMI	2,477E-15	0,005	0,269	1,356	0,656
	202431_s_at	MYC	4,570E-15	0,023	0,514	1,337	1,276
	202964_s_at	RFX5	3,592E-19	0,537	0,747	0,892	0,826
	202963_at	RFX5	4,570E-15	0,021	0,507	1,188	0,813
B	201694_s_at	EGR1	4,570E-15	0,920	0,868	0,413	0,618
	201693_s_at	EGR1	4,570E-15	0,986	1,022	0,863	0,837
	214447_at	ETS1	7,275E-15	0,976	0,971	1,037	1,006
	201464_x_at	JUN	3,592E-19	0,986	1,033	1,020	1,026
	201466_s_at	JUN	2,477E-15	0,668	1,441	1,074	1,088
	213281_at	JUN	4,570E-15	0,808	0,790	0,925	1,048
	201465_s_at	JUN	4,570E-15	0,921	1,113	0,797	0,932
	202400_s_at	SRF	2,476E-15	0,978	0,974	0,982	1,023
	202401_s_at	SRF	3,592E-19	0,927	0,940	1,174	1,153
	203617_x_at	ELK1	1,626E-14	0,833	1,103	0,999	0,971
	210376_x_at	ELK1	3,592E-19	0,759	1,215	0,900	0,879
	210850_s_at	ELK1	7,234E-16	0,964	0,928	0,978	0,969
	205994_at	ELK4	2,477E-15	0,651	0,851	1,109	1,119
	206919_at	ELK4	4,570E-15	0,966	1,042	0,934	0,982
	AFFX-BioB-3_at	FOS	4,570E-15	0,885	0,877	1,181	1,153
	209189_at	FOS	4,570E-15	0,956	1,042	0,807	0,893
	214513_s_at	CREB1	4,570E-15	0,986	1,035	0,814	0,881
	204313_s_at	CREB1	7,233E-16	0,805	1,144	0,774	0,729
	204314_s_at	CREB1	4,570E-15	0,921	1,097	0,901	0,871
	204312_x_at	CREB1	4,570E-15	0,982	0,958	0,848	0,891
	209239_at	NFKB1	4,570E-15	0,402	0,717	1,150	0,962
	205446_s_at	ATF2	1,926E-15	0,991	1,029	1,039	1,125
	212984_at	ATF2	4,570E-15	0,982	0,974	1,120	1,077

Dargestellt sind ausgewählte Gene, die RAS-abhängig im Vergleich HA1ER zu HA1EB reguliert werden, jedoch keine signifikante Expressionsänderung nach U0126-Behandlung zeigen (**A**) bzw. einige Gene, die keinerlei signifikante Expressionsänderung durch RAS oder U0126 aufweisen aber in funktionellem Zusammenhang zu regulierten Genen stehen. (**B**). P-Werte und Ratios: „HA1ER“ entspricht HA1ER vs HA1EB, „HA1ER U“ entspricht HA1ER U0126 vs. HA1ER DMSO, U0 48 bzw. 96-HA1ER mit 48 bzw. 96 h Inkubation 10 µM U0126

4.2.2 Validierung von ERK-Zielgenen mittels Westernblot und RT-PCR

Ein Teil der in Kapitel 4.2.1 vorgestellten potentiellen Zielgene der RAS-MEK/ERK-Signalkaskade wurde weiteren Analysen zur Validierung der beobachteten Regulation unterzogen. Dazu wurde je nach Verfügbarkeit geeigneter Antikörper entweder Westernblot oder RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der Analysen sind in **Abb. 4.6** bis **Abb. 4.10** dargestellt.

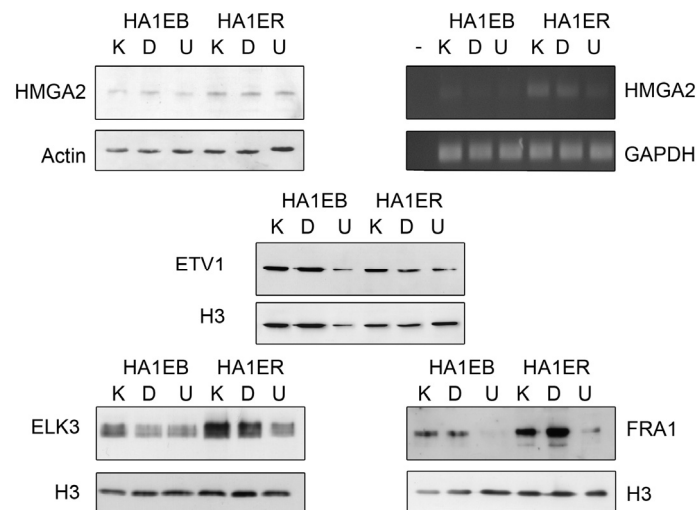


Abb. 4.6: Expression von HMGA2, ETV1, ELK3 und FRA1

Die dargestellten Gene werden im Microarray RAS-abhängig aufreguliert gefunden. HMGA2: links Westernblot, rechts RT-PCR. ETV1, ELK3 und FRA1 Westernblotnachweis. K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126 (10 μ M, 48 h). Als Ladekontrolle diente Histon H3

Die vier in **Abb. 4.6** dargestellten Gene sind im Microarray HRAS-abhängig aufreguliert (**Tab. 4.2**). Im Einzelnachweis auf Protein- und RNA-Ebene konnte diese Regulation nur zum Teil bestätigt werden. So sah man für HMGA1 nach HRAS-Aktivierung bzw. U0126-Behandlung lediglich auf RNA-Ebene (RT-PCR) einen Expressionsunterschied, der auf Proteinebene (Westernblot) nicht validiert werden konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden für ETV1/ER81 erzielt, hier konnte ebenfalls die im Microarray gefundene Regulation nicht validiert werden. Die HRAS-MEK/ERK-abhängige Expressionsänderung von ELK3 und FRA1 ließ sich indes auf Proteinebene bestätigen.

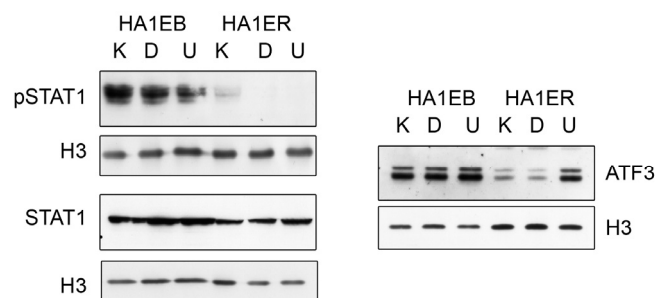


Abb. 4.7: Expression der Gene STAT1 (mit pSTAT1) und ATF3

Die dargestellten Gene sind im Microarray RAS-abhängig abreguliert gefunden worden. K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126 (10 μ M, 48 h)). Als Ladekontrolle diente Histon H3

Für das HRAS-abhängig regulierte STAT1 konnte im Westernblot entgegen der deutlichen Regulierung im Microarray lediglich eine geringe Expressionsverminderung detektiert werden. Bei Betrachtung der Phosphorylierung wurde allerdings ein grosser Unterschied zwischen HA1EB und unbehandelten sowie U0126-behandelten HA1ER nachgewiesen. ATF3 zeigte eine deutliche RAS-MEK-/ERK-abhängige Expressionsverminderung, die durch U0126-Behandlung wieder aufgehoben wurde.

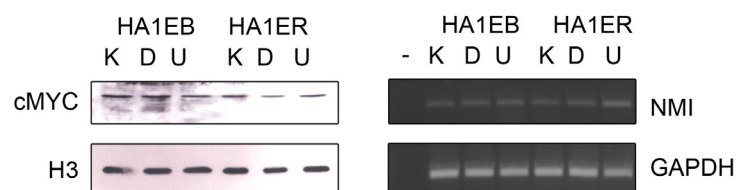


Abb. 4.8: Expression von cMYC und NMI

K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126, Als Ladekontrolle diente im Westernblot Histon H3 und in der RT-PCR GAPDH

Für die HRAS-abhängigen, MEK/ERK-unabhängigen Gene cMYC und NMI sowie RFX5 (Shila Mang-Fatehi, unpublizierte Daten) konnte hinsichtlich der Expression keinerlei Änderung nachgewiesen werden (**Abb. 4.8**).

In **Abb.4.9** sind Transkriptionsfaktoren dargestellt, die keine RAS-MEK-/ERK-abhängige Regulation zeigen (**Tab. 4.3**), aber funktionell mit den regulierten Genen verbunden sind (s. Kapitel 1.4). SRF, der eine Rolle bei der Tumorgenese spielt (Chai et al. 2002) wird weder auf transkriptionellem noch auf posttranslationalem Niveau (pSer103) reguliert, genauso wie CREB (pSer133), der an der SRF-vermittelten Transkription beteiligt ist und mit Mitgliedern des AP-Komplexes interagieren kann (Posern et al. 2006, Selvaraj et al. 2004). Andere Phosphorylierungsstellen wurden nicht betrachtet, daher kann eine Regulierung nicht ausgeschlossen werden.

Neben FRA1 wurden weitere Mitglieder des AP1-Komplexes in die Analyse einbezogen. Dabei zeigte sich (**Abb. 4.10 B**), dass die Expression von cFOS und ATF2 nicht reguliert wird, was bereits im Microarray zu sehen war. JUN konnte aufgrund der schlechten Antikörperqualität nicht in zufriedenstellendem Maße nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich bei der phosphorylierten Form (pSer63) keinerlei Unter-

schied im Vergleich der immortalen und HRAS-transformierten Zelllinien, sowie nach U0126-Behandlung. Auch die phosphorylierte Form von ATF2 (Thr71) zeigt hier keine Unterschiede. Die beiden ETS-Transkriptionsfaktoren ETS1 und EGR1 werden ebenfalls nicht auf transkriptionellem Niveau reguliert. ELK3 ist daher der einzige ETS-Transkriptionsfaktor, der eine deutliche Regulierung zeigt.

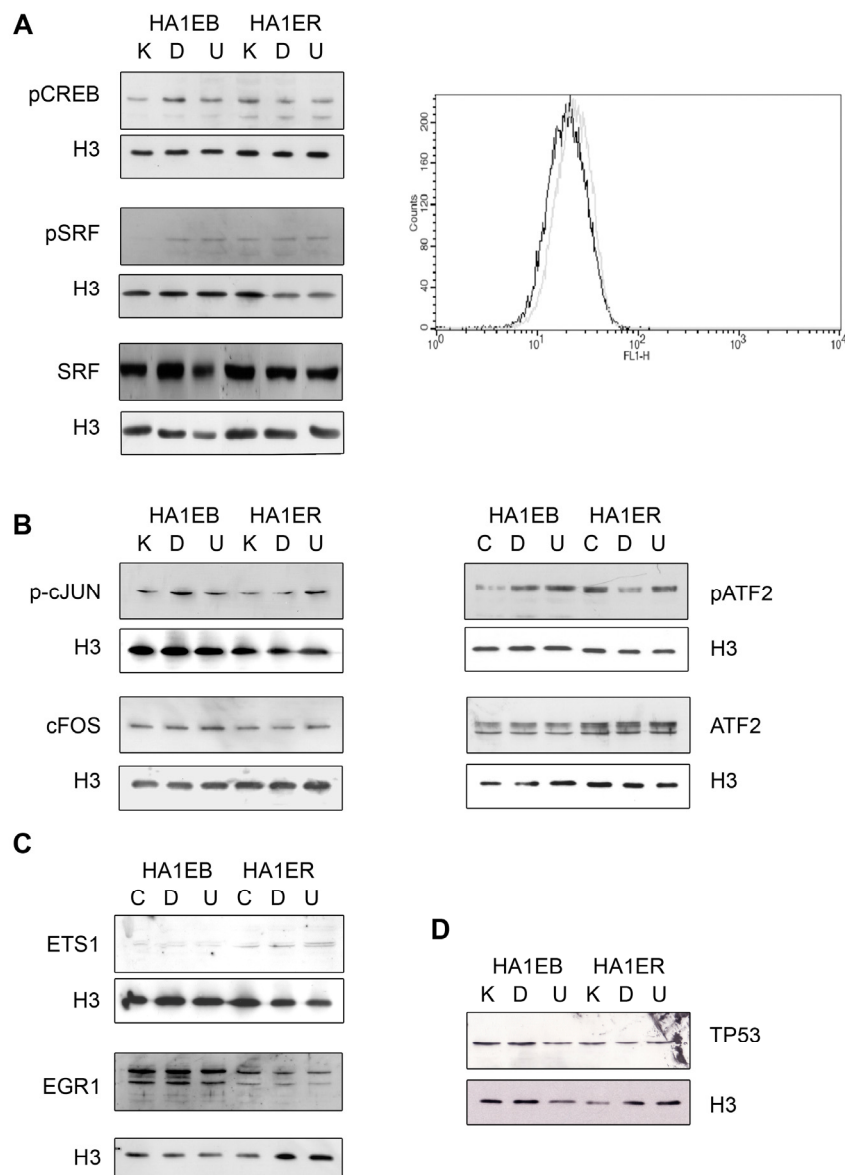


Abb. 4.9: SRF, CREB, ATF2, cFOS und cJUN, ETS1, EGR1 und TP53 Expression

A Expression und Aktivierung von SRF und CREB im Westernblot und Durchflusszytometrie (10.000 Zellen, FL2). **B** Expression und Aktivierung von ATF2, cFOS und cJUN. **C** Expression von ETS1 und EGR1. **D** Expression von TP53. K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126, Als Ladekontrolle diente im Westernblot Histon H3.

4.3 siRNA- vermittelte Hemmung von RAS-ERK Zielgenen

4.3.1 transiente Hemmung der Transkriptionsfaktorexpression

Zielgene

Wie im **Kapitel 4.2.** beschrieben, wurden mehrere Transkriptionsfaktoren als Zielgene der HRAS-vermittelten MEK/ERK-Signaltransduktion validiert. Darunter waren unter anderem die Transkriptionsfaktoren ELK3, HMGA2, ATF3 und FRA1. ELK3 ist möglicherweise als TCF über die Interaktion mit SRF an der Expression von FRA1 beteiligt. ATF3, neben FRA1 ein weiteres Mitglied des AP1-Komplexes, zeigt wie in **Kapitel 4.2.** dargestellt, eine gegensätzliche Regulation zu FRA1 und könnte daher als funktioneller Gegenspieler fungieren (Hamdi et al. 2008). HMGA2 ist ein Transkriptionsfaktor, der als architektonischer Faktor im Rahmen von Differenzierungsprozessen gut charakterisiert ist (Giannini et al. 2000) und in diesem Zusammenhang auch eine Rolle in onkogenen Prozessen spielt (Thuault et al. 2007). Da auch eine Funktion in der Regulation von FRA1 bekannt ist (Vallone et al. 1997), wurde dieses Gen in die weitere Analyse einbezogen. Neben diesen Transkriptionsfaktoren wurde ETV1 analysiert, der wie ELK3 zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren gehört.

Experimentelle Strategie

Transiente siRNA-Experimente zeigen häufig unspezifische Effekte durch die Transfektion kurzkettiger RNA-Sequenzen. Um diese Effekte abzuschätzen war es notwendig, vor der Transfektion spezifischer siRNA Versuche mit unspezifischer siRNA durchzuführen. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden hierzu drei siRNA-Konstrukte (SCR, Scrambled) in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (**Tab. 3.5**).

Für die spezifischen siRNA-Versuche wurden sowohl kommerzielle, als auch selbst selektierte und designte siRNAs getestet. Zum Design eigener siRNAs wurde das unter http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html zu findende Protokoll verwendet und die siRNAs mit dem silencer™-siRNA-construction-Kit

(Ambion/Applied Biosystems) konstruiert. Eine Zusammenfassung der getesteten siRNAs ist den Tabellen **Tab. 3.6** und **Tab. 3.7** zu entnehmen.

Etablierung der Transfektionsbedingungen und Test der SCR-siRNAs

Zunächst wurden Testexperimente durchgeführt, um die optimalen Transfektionsbedingungen zu finden. Aufgrund von Vorarbeiten anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe (Minh Cam Ha-Thi) wurde anfangs mit einer siRNA-Konzentration mit 1-5 nM gearbeitet. Bei höheren Konzentrationen überwiegen toxische Effekte in den verwendeten Zellen. Zur Etablierung der Bedingungen für die kommerziellen siRNAs wurde mit einer Anfangskonzentration von 25 nM nach Herstellerangaben begonnen und eine BLIND-Kontrolle (Transfektion mit Wasser statt siRNA) mitgeführt.

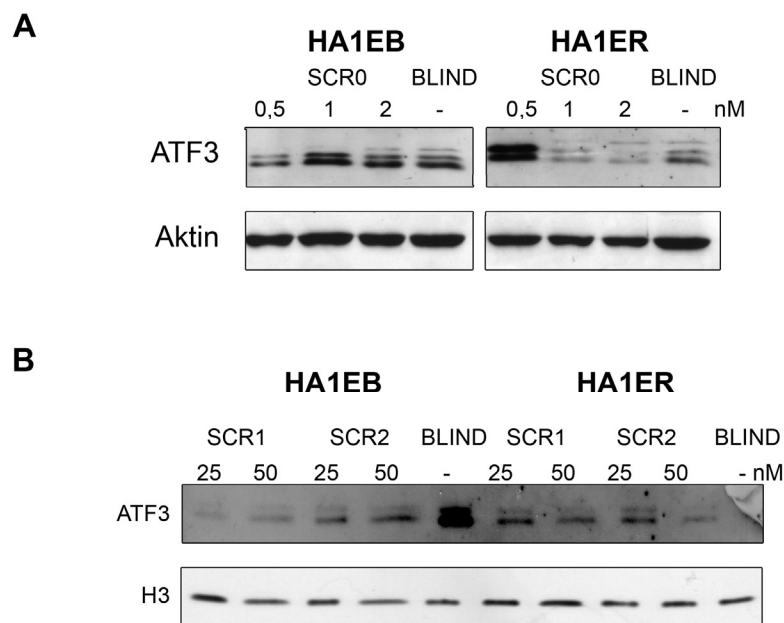


Abb. 4.10: Überprüfung der SCR-Kontrollen am Bsp. von ATF3

A Test SCR0 (Ha-Thi). **B** Test SCR 1 und SCR 2 (kommerziell, Ambion/Applied Biosystems)

SCR- Scrambled, BLIND-Kontrolle mit 3 µl Oligofektamin/well und ohne siRNA. Die siRNA-Inkubation wurde für 48 h nach Ersttransfektion durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit 20 µg Gesamtzelllysate im Westernblot. Als Ladekontrollen wurden Aktin und Histon H3 verwendet.

Beim Test des von Frau Ha-Thi übernommenen SCR0 wurde konzentrationsabhängig ein Einfluss der siRNA auf das Expressionsniveau von ATF3 festgestellt (**Abb. 4.10 A**). In HA1EB ist für die Inkubation mit 0,5 nM siRNA eine leichte Verminderung der Proteinmenge zu sehen, wobei dieselbe Konzentration in HA1ER zu einer starken Expressionserhöhung von ATF3 führt. Zusätzlich traten bereits bei den höheren getesteten Konzentrationen toxische Effekte auf. Daher wurde die siRNA nicht weiter verwendet, sondern zwei weitere SCR-siRNAs (SCR1 und SCR2) getestet. Diese zeigten im Einzelexperiment keine großen Unterschiede zwischen BLIND und SCR in HA1ER (**Abb. 4.10 B**) und konnten daher für die weiteren Versuche verwendet werden.

Zur Bestimmung des optimalen Zeitfensters der siRNA-vermittelten Translationshemmung wurden ebenfalls verschiedene Vorarbeiten herangezogen. In dem zuerst verwendeten Zeitraum von 48 h nach Zweittransfektion (72 h nach Ersttransfektion) liessen sich weder ATF3 noch SRF durch siRNA auf Proteinebene hemmen, so dass zur weiteren Analyse Proben erst 96 h nach Ersttransfektion geerntet wurden. Die Ergebnisse der individuellen siRNA-vermittelten Hemmung sind im Folgenden dargestellt.

Etablierung der siRNA-vermittelten SRF Hemmung

Zur Hemmung von SRF wurden insgesamt drei verschiedene Oligos getestet. Zunächst wurden die beiden selbstkonstruierten SRF-siRNAs (SRF-1 und SRF-2) verwendet (**Abb. 4.11 A**) und in verschiedenen Konzentrationen für 72 h nach Ersttransfektion getestet. Hier konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit SRF-1 in HA1ER zu einer signifikanten Inhibition der SRF-Expression bei allen drei verwendeten Konzentrationen führt. Dieser Effekt ist bei SRF-2 auf Proteinebene nicht zu sehen, hier ist die Effizienz wesentlich geringer. Da die Blotqualität für den exakten Nachweis in HA1EB ungenügend ist, konnte hier das Maß der SRF-Inhibition nicht bestimmt werden. Daher wurde das Experiment noch einmal wiederholt, diesmal für 96 h nach Ersttransfektion (**Abb. 4.11 B**). Auch in diesem Experiment kommt man zu einer guten Hemmung in HA1ER. Parallel hierzu wurde ein drittes kommerzielles

Oligo (SRF-3, Ambion/Applied Biosystems, #142734) getestet (**Abb. 4.11 C**). Dieses zeigte einen guten Effekt sowohl in HA1EB, als auch in HA1ER. Zum Abschluss der Etablierung wurden beide Oligos noch einmal getestet (**Abb. 4.11C**). Für dieses sowie die folgenden SRF-Experimente wurde den Oligos eine neue Bezeichnungsreihenfolge zugeordnet. SRF-1 bleibt die abschliessende Bezeichnung für SRF-1; SRF-2 ist die abschliessende Bezeichnung für SRF-3.

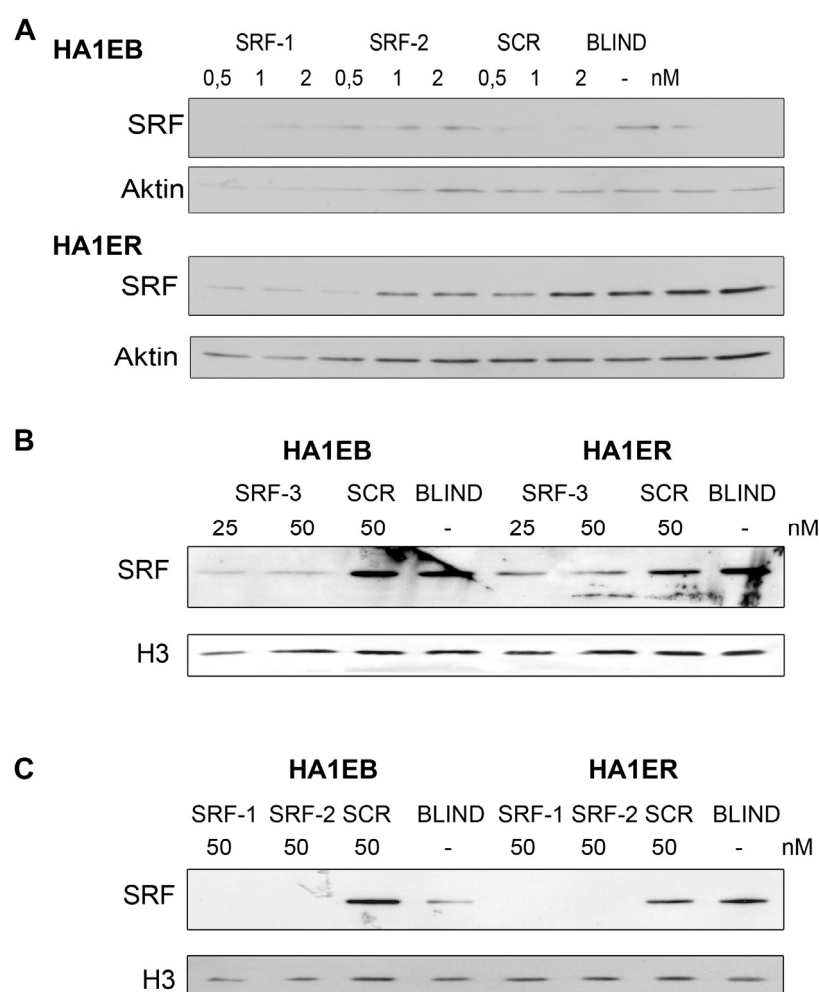


Abb. 4.11: Etablierung der SRF-Hemmung mit den Oligos SRF-1, SRF-2 und SRF-3

SCR- Scrambled, BLIND-Kontrolle mit 3 μ l Oligofektamin/well und ohne siRNA. Die siRNA-Inkubation wurde für 72 h (**A**) bzw. 96 h (**B**) nach Ersttransfektion durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit 20 μ g Gesamtzelllysate im Westernblot. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. **C** Wiederholungsexperiment mit neuer Zuordnung des Oligos SRF-2 (vorher SRF-3)

Für alle durchgeführten Experimente wurden sowohl Proteine als auch RNA geerntet. Daher konnten die erfolgreichen Knockdowns auf Proteinebene auch für weitere Analysen auf RNA-Ebene wie Microarrayanalysen und RT-PCR verwendet werden.

Etablierung der siRNA-vermittelten FRA1 Hemmung

Die translationale Hemmung von FRA1 wurde mit zwei verschiedenen kommerziellen siRNA-Oligos getestet, zunächst 72 h nach Ersttransfektion und nach Adaptierung einheitlicher Bedingungen für alle Experimente 96 h nach Ersttransfektion. Die Ergebnisse sind für FRA1-1 (Ambion/Applied Biosystems, #139508) in **Abb. 4.12 A** und **B** dargestellt. Man sieht für beide Zeitpunkte (**Abb. 4.12 A** und **B**) eine Hemmung von FRA1 auf Proteinebene. Der Effekt ist bei 96 h Inkubationszeit stärker als bei 72 h nach Ersttransfektion. Es sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Konzentrationen (25 nM, 50 nM) erkennbar. Um jedoch eine Einheitlichkeit mit der Transfektion bei SRF aufrechtzuerhalten wurde im Folgenden mit 50 nM weitergearbeitet. Dieses Etablierungsexperiment wurde für das Oligo FRA1-2 (Applied Biosystems, #42204) wiederholt, wie in **Abb. 4.12 C** gezeigt ist. Man sieht einen deutlichen siRNA-Effekt in beiden Zelllinien mit Unterschieden zwischen den einzelnen Konzentrationen. Interessanterweise scheint die höhere siRNA-Konzentration einen geringeren Effekt auf die Expression von FRA1 in HA1ER als in HA1EB zu haben, während dessen die geringere Konzentration in HA1ER eine stärkere Hemmung bewirkt.

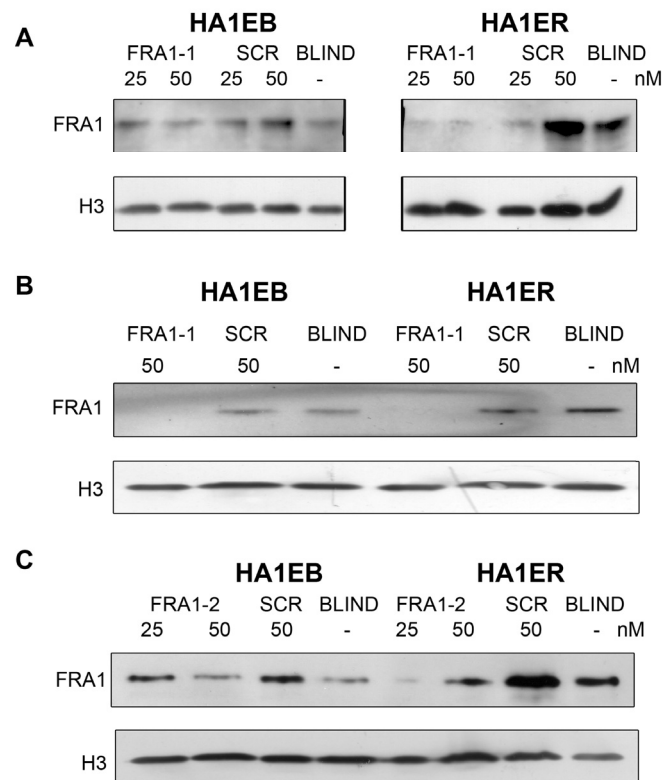


Abb. 4.12: Etablierung der FRA1 Hemmung mit den Oligos FRA1-1 und FRA1-2

A und **B** Effekt des Oligos FRA1-1 72 h (**A**) und 96 h (**B**) nach Ersttransfektion. **C** Effekt des Oligos FRA1-2 96 h nach Ersttransfektion. SCR- Scrambled, BLIND-Kontrolle mit 3 µl Oligofektamin/well ohne siRNA. Die siRNA-Inkubation wurde für **A** 72 h und **B** 96 h nach Ersttransfektion durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit 20 µg Gesamtzelllysate mittels Westernblot. Als Ladekontrolle wurde Histon H3 verwendet.

Etablierung der siRNA-vermittelten ELK3 Hemmung

Für ELK3 wurden ebenfalls zwei siRNA-Oligos getestet (**Abb. 4.19**), von denen jedoch nur ein Oligo (ELK3-2) einen zufriedenstellenden Effekt auf RNA-Ebene herbeiführte. Daher wurde nur mit diesem weitergearbeitet. Die Etablierung der siRNA-Transfektion für ELK3 fand lediglich auf RNA-Ebene statt, da zum Zeitpunkt der Etablierung kein Antikörper gegen ELK3 zur Verfügung stand.

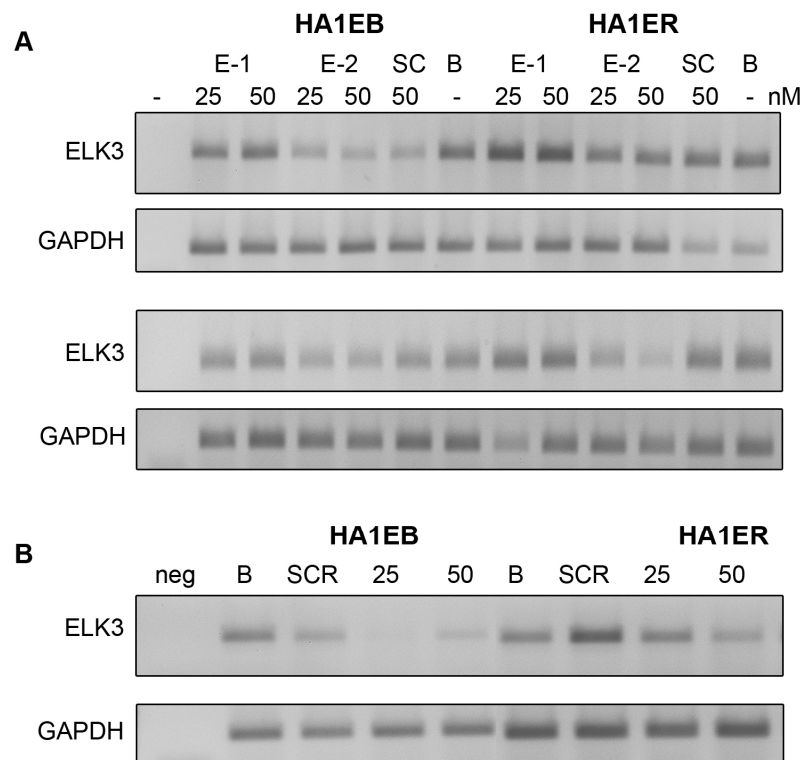


Abb. 4.13: Etablierung der ELK3-Hemmung mit den Oligos ELK3-1 und ELK3-2

A Effekt des Oligos ELK3-1 (E-1, #114511, Applied Biosystems) und ELK3-2 (E-2, #114512, Applied Biosystems) **B** Wiederholung ELK3-2. SCR- Scrambled, BLIND / B-Kontrolle mit 3 µl Oligofektamin/well ohne siRNA. Die siRNA-Inkubation wurde für 96 h nach Ersttransfektion durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit 100 ng RNA in der RT-PCR. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Etablierung der siRNA-vermittelten HMGA1, ATF3 und ETV1-Hemmung

HMGA2, ATF3 und ETV1 wurden ebenfalls siRNA-Experimenten unterzogen. Trotz der Verwendung mehrerer Oligos (siehe **Tab. 3.14**) konnte bei den Experimenten zur Hemmung dieser Gene keine erfolgreichen Ergebnisse erzielt werden. Daher wurden die Gene von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Lediglich HMGA2 war bei der Analyse und Zielgenvalidierung der Transkriptionsfaktoren von weiterem Interesse. Die Resultate der siRNA-Experimente der drei Transkriptionsfaktoren sind in den unten stehenden Abbildungen (**Abb. 4.14** bis **Abb. 4.16**) zusammengefasst.

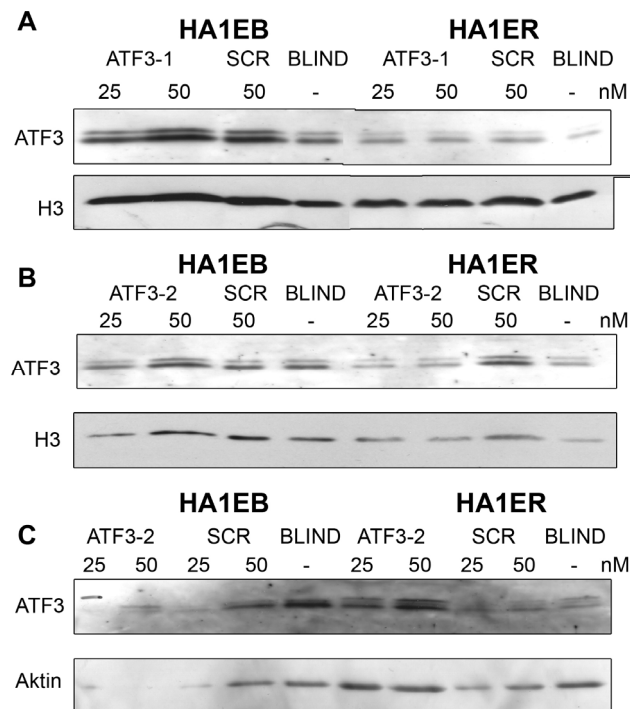


Abb. 4.14: Versuch der ATF3-Hemmung mit den Oligos ATF3-1 und ATF3-2

A ATF3-1 (#241437, Applied Biosystems), **B** und **C** ATF3-2 (#3094, Applied Biosystems). SCR-Scrambled, BLIND-Kontrolle mit 3 μ l Oligofektamin/well ohne siRNA. Die siRNA-Inkubation wurde für 96 h nach Ersttransfektion durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit 20 μ g Gesamtzelllysate im Westernblot. Als Ladekontrolle wurde Histon H3 und Aktin verwendet.

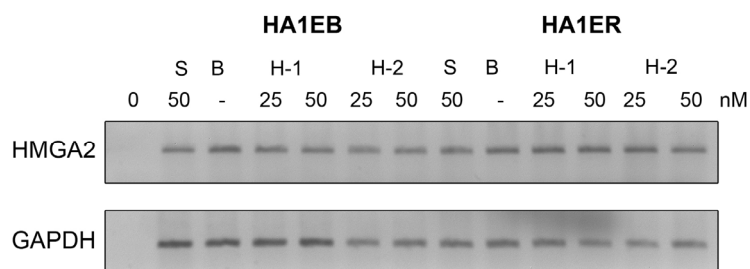


Abb. 4.15: Versuch der HMGA2-Hemmung mit den Oligos HMGA2-1 und HMGA2-2

HMGA2-1 (H-1, #289435, Applied Biosystems), HMGA2-2 (H-2, #279256, Applied Biosystems). S-Scrambled, B-Kontrolle mit 3 μ l Oligofektamin/well ohne siRNA. Die siRNA-Inkubation wurde für 96 h nach Ersttransfektion durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit 100 ng RNA in der RT-PCR. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

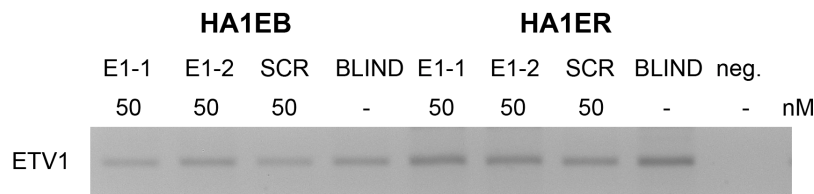


Abb. 4.16: Versuch der ETV1-Hemmung mit den Oligos ETV1-1 und ETV1-2

ETV1-1 (E-1, #115585, Applied Biosystems) und ETV1-2 (E-2, #115584, Applied Biosystems). SCR-Scrambled, BLIND-Kontrolle mit 3 μ l Oligofektamin/well ohne siRNA. Die siRNA-Inkubation wurde für 96 h nach Ersttransfektion durchgeführt. Der Nachweis erfolgte mit 100 ng RNA in der RT-PCR.

4.3.2 ChIP-Etablierung

Definition zu optimierender Parameter

Wie im Methodenteil (**Kapitel 3.3.4**) beschrieben, müssen für eine erfolgreiche ChIP verschiedene Parameter optimiert werden. Dabei richten sich die Bedingungen nach der verwendeten Zelllinie, sowie nach dem zu präzipitierenden DNA-Proteinkomplex. Zu diesen Parametern gehören die Formaldehydinkubation (Zeit, Temperatur), die DNA-Scherrate, Antikörper (qualitative Überprüfung, Spezifität), Präzipitationsbedingungen (Inputmenge, Zeiten, Temperatur, Material), Hintergrundreduzierung vor und nach der Präzipitation sowie ein geeigneter PCR-Nachweis. Zur Optimierung wurden verschiedene Protokolle (Nimblene, Upstate, Invitrogen) miteinander abgeglichen.

Formaldehydinkubation

In den zur Optimierung geeigneten Protokollen wurde in eine Formaldehydinkubation mit 1% Formaldehyd für 10 min vorgeschlagen. Innerhalb dieses Zeitraums sollten DNA und Proteine optimal miteinander eine kovalente Bindung eingehen. In einem der Protokolle wurde eine Inkubation auf Eis indiziert, alle anderen Protokolle sahen eine Inkubation bei Raumtemperatur oder 37 °C vor. Da aus früheren Arbeiten (Diplomarbeit Andrea Solf, 2005) bereits gute Ergebnisse mit 10 min bei 37 °C erzielt werden konnten, wurden diese Bedingungen beibehalten.

Optimierung der DNA-Scherrate

Die ChIP ist eine Methode zur Analyse direkter DNA-Proteininteraktionen. Um diese verlässlich nachweisen zu können, muss das zu präzipitierende Protein in räumlicher Nähe zu den später nachgewiesenen DNA-Sequenzen sein. Daher wird die DNA in kurze Stücke von 100-1000 bp zerlegt. Neben definierten Schnittmethoden (enzymatischer Abbau) kann die DNA auch unspezifisch über mechanische Methoden zerlegt werden. Am geläufigsten ist dabei das Scheren mittels Ultraschall über Kavitation. Diese wirkt umso besser, je geringer die Viskosität der Flüssigkeit ist und je länger bzw. stärker der Impuls ist. Die verschiedenen Parameter wurden einer Optimierungsreihe unterzogen (Tab. 4.4 und Abb. 4.17).

Tab. 4.4: Parameter zur Optimierung der Scherrate

Intervall	HA1EB				HA1ER			
	0,25x10 ⁶	0,5x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	0,25x10 ⁶	0,5x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶
30/30-8	1	5	9	13	17	21	25	29
45/15-8	2	6	10	14	18	22	26	30
30/30-12	3	7	11	15	19	23	27	31
45/15-8	4	8	12	16	20	24	28	32

Probenzuordnung zu Abb. 4.17 in fortlaufenden Nummern unter den Parametern. Intervalle: 30/30 = 30 s Impuls, 30 s Pause, 45/15 = 45 s Impuls, 15 s Pause, 8 = 8 min, 12 = 12 min. Eingesetzte Zellzahlen in 300 µl Flüssigkeit: 0,25x10⁶, 0,5x10⁶, 1x10⁶, 2x10⁶

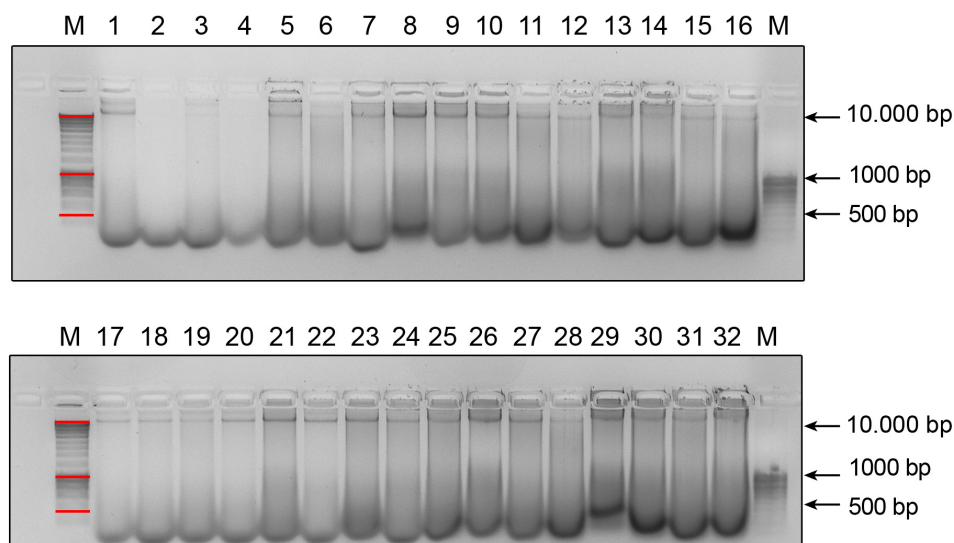


Abb. 4.17: Optimierung der Scherrate

M= Marker; M links-10.000 bp Gibco, M rechts-1000 bp Fermentas. Parameter für fortlaufende Nummern siehe Tab. 4.9

Optimierung der Immunpräzipitation

Für die Präzipitation des korrekten Komplexes ist es von essentieller Bedeutung, dass die Spezifität des Antikörpers im normalen Westernblot und in der Präzipitation garantiert werden kann. Ausserdem sind einige Antikörper nicht für die ChIP geeignet, müssen also erst getestet werden. In den vorliegenden Versuchen wurde zum größten Teil mit einer Charge des Santa-Cruz-Antikörpers E161 gegen FRA1 gearbeitet. Dessen Spezifität und Güte für die Präzipitation konnte umfassend dokumentiert werden und ist in **Abb 4.18** als Westernblot gezeigt.

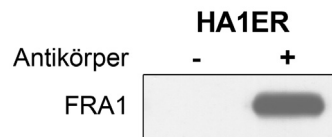


Abb. 4.18: Immunpräzipitattest FRA1(R20) LOT: E161 ,#sc-605, Santa Cruz
Westernblot mit 5 µl Präzipitat aus der ChIP, Präzipitation mit (+) und ohne Antikörper (-)

Leider stand diese Antikörpercharge nicht für alle Experimente zur Verfügung. Fast alle in der IP getesteten anderen Chargen (R20-LOT: I0908, C012 und G0904) zeigten eine Reihe unspezifischer Banden (**Abb. 4.19**). Eine spezifische Charge zur Präzipitation konnte erst im in Abb. 4.20 dargestellten FRA1-Antikörpers N17 (sc-183, LOT: F1708) gefunden werden. Für diese wurde zudem ein spezifisches Blockpeptid getestet (scN17-BP) um die Spezifität des Antikörpers nachzuweisen (**Abb. 4.20**).

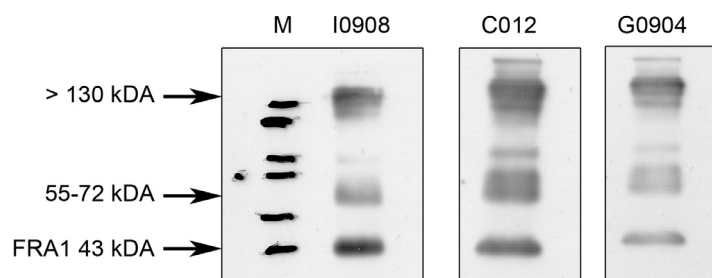


Abb. 4.19: Immunpräzipitation unspezifischer Antikörperchargen für FRA1
ChIP in HA1ER; getestet wurden sc-605 (R20, LOT: I0908, C012 und G0904).

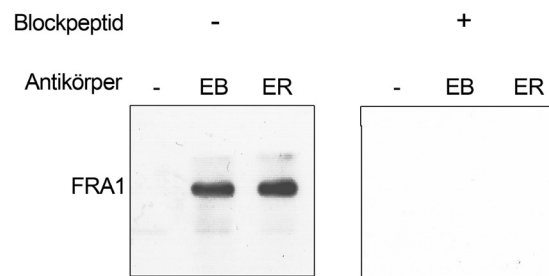


Abb. 4.20: Nachweis der Spezifität des Antikörpers FRA1-N17 (sc-183, LOT:F1708)
ChIP in HA1ER nach Standardbedingungen, Blockingpeptid-Inkubation mit dem Primärantikörper im Verhältnis 10:1 für 1 h bei RT, Inkubation der Membran mit dem Komplex unter Standardbedingungen

Präzipitationsbedingungen

Zu den optimierbaren Parametern gehören Zeiten, Temperatur und Material. Der größte Teil der Bedingungen wurden aus dem ChIP-Protokoll nach Nimblegene übernommen. Abweichungen gab es nach dem DNA-Scheren, sowie bei Reduzierung des Hintergrunds vor der IP. Zudem wurden alle Proben nach der Sonifizierung für 5 min bei 10.000 xg zentrifugiert, das Präzipitat verworfen und nur mit dem Überstand weitergearbeitet. Außerdem wurde vor der IP eine Reduzierung des unspezifischen Hintergrunds durch einstündige Inkubation mit unbeladenen, vorgeblockten Beads durchgeführt, nach der IP ein weiterer Tube-Shift zur Reduzierung des Hintergrunds eingefügt und die Präzipitate vor der Elution noch einmal mit 1x TE gewaschen. Die Zusammenfassung des Protokolls ist in Kapitel 3.5.4 zu finden.

Inputmenge

Die Inputmenge richtet sich nach der Präzipitationseffizienz und dem Gehalt an nachzuweisendem Protein. Da der native Gehalt an FRA1 quantitativ nicht abschätzbar war, wurde die Präzipitation so optimiert, dass nach Aufreinigung der DNA zum Schluss genug DNA zur Durchführung mehrerer PCRs angereichert werden konnte (250-1000ng). In der Endfassung des Protokolls wurden jeweils 6×10^6 Zellen geerntet, die für die Sonifizierung in 3 Proben à 300 µl getrennt und für die anschließenden Schritte (IP und Post-IP-Prozessierung) wieder vereinigt wurden.

4.4 Transkriptionelle Netzwerke von SRF, FRA1 und ELK3

4.4.1 Phänotypische Untersuchungen

Nach dem Etablieren der siRNA-Bedingungen wurden zunächst die globalen Auswirkungen der siRNA auf das Wachstum der behandelten Zellen untersucht. Dazu wurden Wachstumsassays in Kulturschalen vorgenommen, die mittels MTT ausgewertet wurden und Softagarassays, die visuell analysiert wurden.

Wachstumsanalyse in 96-wells mittels MTT

Der MTT der siRNA-behandelten Zellen wurde für 96 h nach Zweittransfektion durchgeführt. Dabei wurde (**Abb. 4.26**) ein starker Effekt auf das Wachstum der behandelten HA1ER-Zellen beobachtet. So wachsen sämtliche siRNA-behandelten Zellen wesentlich schlechter, als die BLIND- und SCR-Kontrollen. Die Inkubation von Zellen unter Transfektionsbedingungen (BLIND) bzw. mit unspezifischer siRNA (SCR) hat somit keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen, was darauf schließen lässt, dass der hier beobachtete Effekt spezifisch auf die Behandlung mit siRNA gegen SRF, FRA1 und ELK3 zurückzuführen ist.

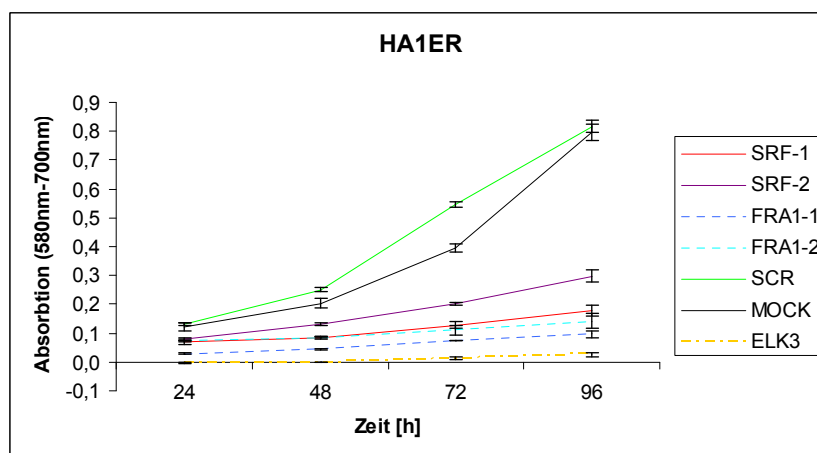


Abb. 4.21: MTT-assay von SRF, FRA1 und ELK3-siRNA behandelten HA1ER

MTT für 96h nach Zweittransfektion. Die Zellen wurden in 6wells transfiziert und für den MTT in 96well-Platten umgesetzt. Pro well wurden 1500 Zellen eingesät. Die Messung erfolgte alle 24 h bei 580 nm und 700 nm im Biorad Plattenreader

Analyse ankerunabhängigen Wachstums mittels Weichagar

Um den Effekt auf das ankerunabhängige Wachstum der HRAS-transformierten HA1ER-Zellen zu analysieren wurden Softagarexperimente durchgeführt. Hier wurden nach zweifacher siRNA-Transfektionen die Zellen trypsinisiert und 1×10^5 Zellen pro 20 ml Weichagar eingesät. Die Auswertung erfolgte nach 21 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.22** dargestellt. Zum Vergleich wurden auch BLIND-behandelte HA1EB- und HA1ER-Zellen in die Versuchsreihe aufgenommen. Die immortalen HA1EB wiesen kein ankerunabhängiges Wachstum auf. Dagegen wuchsen sowohl die BLIND-behandelten, als auch die SCR-behandelten HA1ER in Weichagar sehr gut. Es kam bereits nach der transienten Transfektion mit siRNA zu einer starken Wachstumsreduktion, die bis zum vollständigen Verlust der Fähigkeit zu ankerunabhängigem Wachstum führte.



Abb. 4.22: Weichagarassay zur Analyse des ankerunabhängigen Wachstums

HA1EB und HA1ER wurden zweifach im Abstand von 24 h in 6well-Platten transfiziert. Auffällige Kolonien in den jeweiligen Ansätzen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.4.2. Microarrayanalyse

Für die genomweite Analyse direkter und indirekter Zielgene der Transkriptionsfaktoren SRF, FRA1 und ELK3 wurden siRNA-Experimente analog der in Kapitel 3 vorgestellten Vorgehensweise durchgeführt. Die RNA wurde wie im Teil 4.2 vorgestellt prozessiert und auf HG-U133A- Microarrays in biologischen Duplikaten hybridisiert. Um die unspezifischen Effekte der siRNAs beurteilen zu können, wurden neben dem in den Einzelexperimenten verwendeten SCR-Pool (Dharmacon) auch die unspezifische siRNA der Firma Ambion (Applied Biosystems) in die Analyse einbezogen. Eine Gesamtdarstellung der hybridisierten Proben ist in **Tab. 4.5** zu finden.

Tab. 4.5: Hybridisierte Proben der SRF-, FRA1- und ELK3-siRNA-Experimente

HA1EB	HA1ER	Verweis auf zugehörige siRNA Experimente
SRF-1	SRF-1	Abb. 4.11 A und C
SRF-2	SRF-2	Abb. 4.11 B und C
ELK3	ELK3	Abb. 4.13
FRA1-1	FRA1-1	Abb. 4.12 A
FRA1-2	FRA1-2	Abb. 4.12 B
SCR-1	SCR-1	Abb. 4.10
SCR-2	SCR-2	Abb. 4.10 und Abb. 4.11 B
BLIND	BLIND	Abb. 4.10 und Abb. 4.11 B

Für SRF, FRA1 und SCR wurden Proben zweier unterschiedlicher siRNA-Behandlungen (1, 2) hybridisiert. Die entsprechenden Hemmungproben sind in der jeweils dritten Spalte von HA1EB bzw. HA2ER aufgeführt. Es wurden jeweils zwei biologische Kontrollen hybridisiert.

Die Normalisierung und P-Werte-Generierung fand analog den vorangegangenen Microarrayanalysen im MPI für molekulare Genetik bei Christine Steinhoff statt. Nach qualitativer Datenanalyse der unbehandelten BLIND-Proben wurde festgestellt, dass sich BLIND-b nicht zur Normalisierung der Daten eignete, da für verschiedene Kontrollgene im Microarray kein Unterschied zwischen HA1EB und HA1ER ermittelt werden konnte bzw. der BLINDa den Unterschied zwischen HA1EB und HA1ER im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen besser repräsentierte (**Tab. 4.6**). Die Daten wurden daher über BLINDa normalisiert. Parallel dazu wurde festgestellt, dass sich die Datensets der unspezifischen siRNA-Behandlung (SCR-1 und SCR-2) der Firmen Ambion/Applied Biosystems (SCR-1) und Dharmacon

(SCR-2) im Vergleich mit der BLINDa Kontrolle stark unterschieden. Dies wurde bereits bei den Vorexperimenten der siRNA-Experimente beobachtet (Kapitel 4.3). Im Vergleich von SCR1 und SCR2 zur BLIND-Kontrolle wurden bei SCR1 mehr regulierte Gene in HA1EB und HA1ER (+/- Faktor 1,5) gefunden, als bei SCR2. Dies ist insbesondere bei HA1ER zu sehen, hier werden mit SCR1 8418 regulierte IDs im Bezug auf BLIND gefunden, mit SCR2 lediglich 4907. In Tab. 4.6 sind signifikante zwischen SCR- und BLIND-Kontrollen regulierte Gene zusammengefasst. Die hier dargestellten Faktoren sind Indikatoren des Gesamtverhaltens der HRAS-transfizierten HA1ER im Vergleich zu den immortalen HA1EB, da sie wichtige Funktionen des Zellzyklus und der Proliferation und Differenzierung steuern. Zudem sind einige der gezeigten Gene bereits aus der ersten Phase der Arbeit als HRAS-abhängig differentiell regulierte Gene bekannt. Die Expressionsunterschiede von SCR- und BLIND-behandelten Proben sind daher nicht mit den Expressionsunterschieden von SCR- und unbehandelten Kontrollen (K) vergleichbar.

Tab. 4.6: Kontrollgenvergleich BLINDa vs. BLINDb

Symbol	BLINDa	BLINDb	K	Symbol	BLINDa	BLINDb	K
CD44	1,004	0,683	1,014	MAP2K3	1,200	3,095	1,786
DUSP4	2,037	3,360	2,225	MAP3K7	1,374	2,017	1,409
DUSP6	6,731	28,740	7,620	PAX8	1,919	0,987	1,597
FOSL1	1,528	10,505	2,563	SMARCA4	0,740	2,087	0,887
HRAS	1,665	3,953	2,154	TIMP3	1,268	4,621	1,293
IFI44	0,011	0,161	0,038	VEGFB	1,059	2,241	1,344

Dargestellt ist jeweils der Vergleich der BLIND oder unbehandelten Kontrollen (K) von HA1ER vs. HA1EB.

Tab. 4.7: Vergleich SCR-1 und SCR-2 vs. BLIND

Vergleich	regulierte IDs
HA1EB SCR1/BLINDa	10246
HA1EB SCR2/BLINDa	8403
HA1ER SCR1/BLINDa	8418
HA1ER SCR2/BLINDa	4907

Verglichen wurden HA1EB und HA1ER SCR1 bzw. SCR2 vs. BLINDa. Dabei wurde als Grenzwert jeweils Auf- oder Abregulation der ID um den Faktor 1,5 gesetzt.

Nach der Analyse der beiden SCR-Kontrollen wurde aufgrund der besseren Übereinstimmung der BLIND-Daten mit SCR2 festgelegt, die P-Wert-Generierung lediglich

unter Zuhilfenahme von SCR2 vorzunehmen. Als P-Grenzwert wurde 0,05 festgesetzt. So konnten zunächst statistisch mögliche Zielgene der verschiedenen Transkriptionsfaktoren eingegrenzt werden. Die Ergebnisse dieser ersten Analyse sind in **Tab 4.8** dargestellt. Statistisch gesehen zeigen die Daten der SRF-siRNA-Experimente die meisten deregulierten Sets, FRA1 und ELK3 wesentlich weniger. In allen betrachteten Experimenten liegt das Verhältnis auf- und abregulierter Datensets im Rahmen 1:1.

Tab. 4.8: Regulierte Gene nach der siRNA Hemmung von SRF-, ELK3- und FRA1

Zelllinie	Hemmung	P-Wert < 0,05	siRNA < SCR	siRNA > SCR
HA1EB	SRF	2024	922	1102
	FRA1	1924	812	1112
	ELK3	1007	457	552
HA1ER	SRF	2182	867	1315
	FRA1	812	438	374
	ELK3	676	374	302

Dargestellt ist die Anzahl der Affymetrix-IDs, die nach siRNA-Behandlung eine Regulierung mit P-Wert < 0,05 zeigen sowie die Aufschlüsselung in abregulierte (siRNA < SCR) und aufregulierte Gene (siRNA > SCR).

Die vollständige Aufstellung der regulierten Gene ist im Anhang unter **Tab. III** bis **Tab. VIII** zu finden.

Überlappungen von potentiellen Zielgenen der Transkriptionsfaktoren

Um die Fragestellung zu bearbeiten, ob es Überschneidungen in den Zielgenen der einzelnen Transkriptionsfaktoren gibt oder ob sich die Zielgene eines Faktors RAS-abhängig unterscheiden lassen, wurden verschiedene Schnittmengen der in **Tab. 4.8** dargestellten Daten generiert und analysiert (**Tab. 4.9**).

Tab. 4.9: generierte Schnittmengen der regulierten Gene (P-Wert < 0,05)

Zellen und Vergleiche	Transkriptionsfaktoren und Vergleiche
HA1EB \cap HA1ER	SRF
	FRA1
	ELK3
HA1EB	SRF \cap FRA1 \cap ELK3
HA1ER	SRF \cap FRA1 \cap ELK3

Es wurde zunächst untersucht, wie groß die Überlappung der regulierten Gene ist und ob es signifikante Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen den zu vergleichenden Daten gibt. In **Abb. 4.23A** und **B** ist zu sehen, dass es sowohl in HA1EB, als auch in HA1ER zur Überlappung der potentiellen Zielgene der drei Transkriptionsfaktoren kommt. Jedoch ist diese Schnittmenge im Vergleich zur Gesamtmenge der regulierten Gene klein. Es fällt auf, dass in HA1EB mehr Datensets unter eine gemeinsame Regulierung von SRF, FRA1 und ELK3 fallen als in HA1ER. Dies kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass die von FRA1 regulierten Datensets in HA1ER mit 415 IDs um fast 2/3 geringer sind als in HA1EB. Hier werden 1165 IDs durch die siRNA-vermittelte Hemmung von FRA1 reguliert.

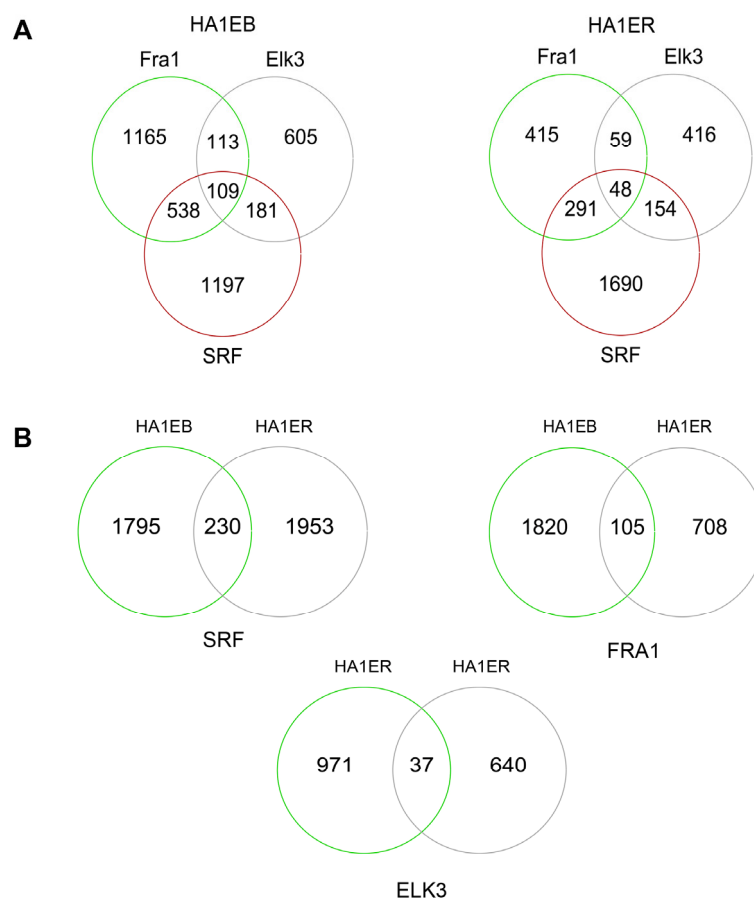


Abb. 4.23: Graphische Darstellung der analysierten Schnittmengen

Dargestellt sind die jeweiligen Überlappungen der analysierten Datensets. **A** Überlappung aller erhobenen Daten der TranskriptionsfaktorHemmung in HA1EB und HA1ER. **B** Überlappungen der Daten der einzelnen Hemmung in HA1EB und HA1ER.

In den Analysen fällt auf, dass in den siRNA-Experimenten im Vergleich der immortalen und HRAS-transformierten Zellen unterschiedliche Gene (respektive IDs) durch die spezifische Hemmung von SRF, ELK3 und FRA1 angesprochen werden. Um dieses Phänomen näher zu analysieren, wurden GO-Analysen durchgeführt, bei denen die regulierten Gengruppen nach ihrem Gehalt an Transkriptionsfaktoren durchsucht wurden. Die so bestimmten Transkriptionsfaktoren wurden mittels einer weiteren GO-Analyse auf ihre biologische Funktion hin analysiert (**Anhang Tab. IX bis XI**).

Durch die Schnittmengenanalyse der siRNA-Experimente von SRF, ELK3 und FRA1 in HA1EB und HA1ER (**Anhang Tab. IX**) konnte eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die von SRF, FRA1 und ELK3 gemeinsam reguliert werden. Zwischen HA1EB und HA1ER gibt es jedoch große Unterschiede der angesteuerten Funktionen. Während es in den HA1EB-Zellen neben „Cellular Metabolism“ eine Anreicherung in „Development“ und „Posttranslational Protein Modification“ gibt, konnte in HA1ER lediglich eine Anreicherung in „Cellular Metabolism“ gezeigt werden. Dies kann damit zusammenhängen, dass die Gruppe von Genen in der Schnittmenge wesentlich kleiner ist als in HA1ER und so auch eine signifikante Anreicherung schwieriger zu bestimmen ist. Neben den GO-Anreicherungen gibt es einige Besonderheiten, die den Unterschied zwischen HA1EB und HA1ER verdeutlichen: So findet man ausschließlich in HA1EB Transkriptionsfaktoren, die bei der Immunantwort der Zelle eine Rolle spielen (SOX18, SAP18). Dagegen gibt es in HA1ER durch das Auftreten von NPAS2 eine möglich Verbindung zur Steuerung zirkadianer Prozesse. Es gibt keine direkten Überlappungen gemeinsam gesteuerter Gene zwischen HA1EB und HA1ER, die SRF-, ELK3- und FRA1- abhängig regulierten Gene sind zelllinienspezifisch.

Für die jeweilsspezifische Hemmung von SRF, FRA1 und ELK3 wurden Schnittmengen der regulierten Gene von HA1EB und HA1ER erstellt (**Anhang Tab. X**). Diese wurden nach Transkriptionsfaktoren durchsucht, welche nach ihrer biologischen Funktion mittels GO klassifiziert wurden. Die Schnittmengen dieser siRNA-Experimente zeigten zu den oben vorgestellten Analysen interessante Abwei-

chungen. So sind Transkriptionsfaktoren in den gemeinsam in HA1EB und HA1ER regulierten Datensets statistisch unterrepräsentiert. Lediglich ca. 5% der IDs können Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden. In der Schnittmenge des Transkriptionsfaktors ELK3 sind keine Transkriptionsfaktoren identifizierbar. Dagegen werden in den oben betrachteten zellspezifischen Überlappungen fast $\frac{1}{4}$ der Daten durch Transkriptionsfaktoren repräsentiert. Die Transkriptionsfaktoren, die hier identifiziert werden konnten sind zudem in wenige biologische Prozesse involviert. Zum größten Teil steuern sie Gene metabolischer Prozesse. Lediglich bei SRF-siRNA-Hemmung ist zusätzlich eine Anreicherung von Entwicklungsprozess-Genen erkennbar.

Im Weiteren wurden die regulierten Daten in HA1ER analysiert. Dazu wurde hier ebenfalls der Anteil an Transkriptionsfaktoren ermittelt und diese einer GO-Clusteranalyse unterzogen (**Anhang Tab. XI**). Dabei wurde folgendes beobachtet:

Die SRF-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren (**Anhang Tab. XI A**) in HA1ER repräsentieren zum überwiegenden Teil Gene, die an der Steuerung zellulärer metabolischer Prozesse beteiligt sind. Andere GO-Klassen, die Beeinflussung von Differenzierung und Entwicklung, Apoptose und Immunantwort, sowie Chromatinmodifizierung werden nur von einzelnen Genen getragen. Das Datenset beinhaltet einige bereits bekannte Gene der RAS-abhängigen Transkription (RB1, FOS, ETV1, ELK4, SOX4, STAT3), SRF, sowie einige uncharakterisierte Gene, wie TCFL5 und HMG20A.

Auch in der GO-Analyse der vom FRA1-abhängigen Gene sind Transkriptionsfaktoren identifizierbar, die an der Regulierung metabolischer Prozesse beteiligt sind (**Anhang Tab XI B.**), während andere Funktionen (Chromatinmodifizierung, Apoptose, Entzündung) nur von einzelnen Genen repräsentiert werden. Interessanterweise werden hier, wie auch nach der SRF-Hemmung, Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie identifiziert, die an der Regulation zellulären Überlebens, Wachstums und Proliferation von Zellen beteiligt sind. Mit Ausnahmen von TCF3 und TCFL5 werden von SRF und FRA1 jeweils unterschiedliche Gene angesprochen.

Wie bereits bei SRF- und FRA1-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren überwiegen auch bei ELK3 Gene, die an der Steuerung metabolischer Prozesse beteiligt sind (**Anhang Tab. XI C**). Hinzu kommen Regulatoren des Zellzyklus, der Apoptose und der zellulären Antwort auf DNA-Schädigungen. Allerdings sind diese Funktionen ähnlich wie bei den SRF und FRA1-Daten nur durch einzelne Gene repräsentiert.

Da die hier durchgeführten GO-Analysen der vorhandenen Transkriptionsfaktoren außer für den Funktionsbereich des zellulären Metabolismus keinerlei Anreicherungen zeigten, wurden weitere bioinformatische Methoden angewandt, um die regulierten Daten genauer zu analysieren.

4.4.3 GSEA basierte GO-Analyse

In den HA1EB-Zellen wurde in der Analyse im Datenset der SRF-siRNA-abhängig abregulierten IDs eine Anreicherung festgestellt (**Tab. 4.10 A**). Diese wies auf eine Verbindung der angereicherten Gene mit Prozessen der Homöostase hin. Für die HRAS^{V12}-transformierten HA1ER konnten interessanterweise in den FRA1- und ELK3-Gensets, nicht jedoch im SRF-Genset, Anreicherungen identifiziert werden. Eine Zusammenfassung für SRF und ELK3 ist der Tabelle **Tab. 4.10** zu entnehmen.

Die GSEA-GO-Analyse der durch ELK3-Hemmung regulierten Gene (**Tab. 4.10 B** und **Tab. 4.10 C**) zeigt eine Anreicherung im Bereich zellulärer Lokalisationen. Interessanterweise finden sich Gene, deren Proteine im Nukleus nachweisbar sind im durch ELK3-Hemmung aufregulierten Datenset, während Gene extrazellulärer Proteine durch die ELK3-Hemmung in ihrer Expression vermindert werden. Hinzu kommt für ELK3 eine Anreicherung von Genen, die in der Antwort auf chemische Stimuli involviert sind. Ob diese und die Gene der extrazellulären Region miteinander überlappen, wurde nicht weiter untersucht.

Tab. 4.10: GSEA-GO-Analyse regulierter Gene der siRNA-Experimente in HA1EB und HA1ER

analysiertes Datenset	GO Annotation	FDR Q-Wert
A HA1EB SRF abreguliert	<i>"Biological Process"</i>	
	Ion homeostase	0.015
	Chemical Homeostase	0.016
	Regulation of multicellular organismal process	0.018
	Homeostatic process	0.05
B HA1ER ELK3 aufreguliert	<i>"Cellular Component"</i>	
	Nucleus	0.009
	Nuclear_part	0.021
C HA1ER ELK3 abreguliert	<i>"Cellular Component", "Biological Process"</i>	
	Extracellular region	0.001
	Response to chemical stimulus	0.001
	Extracellular region part	0.014

Dargestellt sind die Analysen der Gene, die einen statistischen P-Wert von $<0,05$ in den Expressionsprofilen der SRF und ELK3-siRNA-behandelten HA1EB- und HA1ER-Zellen aufwiesen

Nach der siRNA-vermittelter Hemmung von FRA1 konnten lediglich in der Gruppe der siRNA-abhängig abregulierten Gene Anreicherungen für GO-Annotationen identifiziert werden. Dabei handelt es sich einerseits um Transkriptionsfaktoren, andererseits um Gene, die in zellulären metabolischen Prozessen eine Rolle spielen (Tab. 4.11). Die Gruppe der Transkriptionsfaktoren überlappt zum Teil mit den Transkriptionsfaktoren, die bereits in der vorherigen Analyse identifiziert wurden und wurde aus diesem Grund weiter analysiert.

Tab. 4.11: GSEA-GO-Analyse regulierter Gene der FRA1- siRNA-Experimente in HA1ER

GO annotation (Biological Process)	FDR q-val
Transcription factor activity	0.006
Regulation of cellular metabolic process	0.023

Dargestellt sind die Analysen der Gene, die einen statistischen P-Wert von $<0,05$ in den Expressionsprofilen der FRA1-siRNA-behandelten HA1ER-Zellen aufwiesen

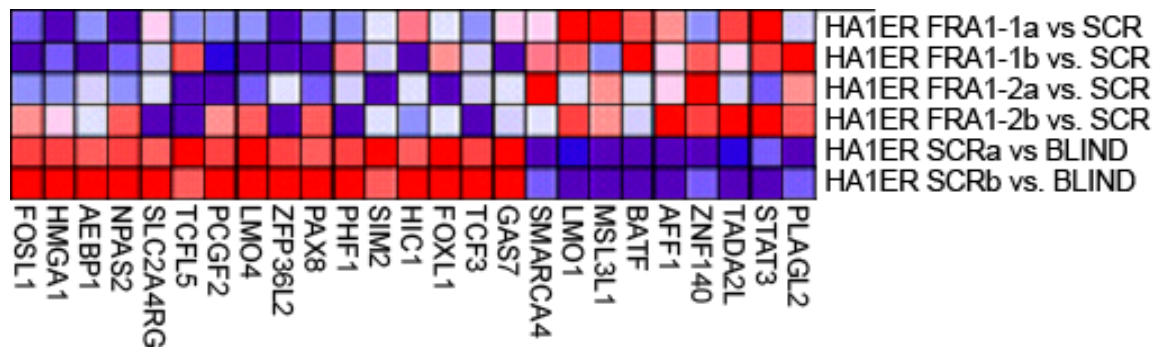


Abb. 4.24: Übersicht Regulierung des GO-GSEA-Datensets „transcription factor activity“ nach Hemmung von FRA1 in HA1ER- (abregulierte IDs).

Rot-aufreguliert, blau-abreguliert

Tab. 4.12: Differentiell regulierte Gene („transcription factor activity“) der GSEA-GO-Analyse in FRA1-siRNA-behandelten HA1ER-Zellen

ID	Symbol	Ratio		HA1ER	
		SCR	BLIND	FRA1-1	FRA1-2
201792_at	AEBP1	1,090	1,673	0,351	0,505
201924_at	AFF1	0,516	0,694	1,019	1,158
215451_s_at	AFF1	0,872	1,326	0,880	0,969
205965_at	BATF	0,833	1,287	1,360	1,117
204420_at	FOSL1	4,294	1,528	0,132	0,325
216572_at	FOXL1	1,084	1,522	0,856	0,734
202191_s_at	GAS7	0,708	0,955	1,195	1,154
202192_s_at	GAS7	0,903	0,742	1,010	0,790
207704_s_at	GAS7	0,851	0,949	0,905	0,924
210872_x_at	GAS7	0,849	0,969	0,848	0,887
211067_s_at	GAS7	0,839	0,733	0,989	0,747
208461_at	HIC1	1,044	1,065	0,787	0,784
206074_s_at	HMGA1	4,074	1,933	0,301	0,451
210457_x_at	HMGA1	2,314	2,112	0,272	0,510
208025_s_at	HMGA2	3,389	1,195	1,156	3,253
206718_at	LMO1	0,758	1,110	1,214	1,154
209204_at	LMO4	0,930	0,882	0,501	0,675
209205_s_at	LMO4	1,486	0,811	0,396	0,619
213551_x_at	LOC284106	0,831	0,873	0,890	0,829
214239_x_at	LOC284106	1,008	0,847	0,536	0,592
207551_s_at	MSL3L1	1,211	0,902	1,058	1,450
205459_s_at	NPAS2	2,884	6,608	0,394	0,696
205460_at	NPAS2	5,306	7,145	0,501	1,027
213462_at	NPAS2	10,116	8,453	0,550	0,705
39549_at	NPAS2	8,475	5,328	0,451	0,928

Dargestellt sind die Ratios nach siRNA-Transfektion in HA1ER SCR-Scrambled, Ratios: **SCR**-HA1ER-SCR vs. HA1EB-SCR, **BLIND**-HA1ER BLIND vs. HA1EB-BLIND, **FRA1-1/2**- HA1ER FRA1-1/2 vs. HA1ER SCR

Tab. 4.13: Fortsetzung Differenziell regulierte Gene („transcription factor activity“) der GSEA-GO-Analyse in FRA1-siRNA-behandelten HA1ER-Zellen

ID	Symbol	Ratio		HA1ER	
		SCR	BLIND	FRA1-1	FRA1-2
121_at	PAX8	1,413	1,146	0,509	0,665
207921_x_at	PAX8	1,034	1,795	0,499	0,687
207923_x_at	PAX8	1,003	1,720	0,503	0,633
207924_x_at	PAX8	1,023	1,901	0,457	0,610
209552_at	PAX8	1,102	1,099	0,342	0,527
213917_at	PAX8	1,687	1,593	0,526	0,550
214528_s_at	PAX8	1,280	1,919	0,420	0,627
221990_at	PAX8	0,860	0,970	0,540	0,737
203792_x_at	PCGF2	0,878	1,042	0,772	0,975
203793_x_at	PCGF2	0,971	0,993	0,934	0,717
202928_s_at	PHF1	1,154	1,344	0,834	0,654
40446_at	PHF1	1,590	1,643	0,742	0,671
202924_s_at	PLAGL2	0,986	1,056	1,414	1,432
202925_s_at	PLAGL2	1,362	0,756	0,890	0,890
206558_at	SIM2	0,853	1,239	0,776	0,716
208157_at	SIM2	1,185	0,974	0,879	0,779
218494_s_at	SLC2A4RG	1,257	1,672	0,608	0,492
208793_x_at	SMARCA4	0,834	0,766	1,243	1,004
208794_s_at	SMARCA4	0,941	0,467	0,962	0,863
212520_s_at	SMARCA4	0,871	0,740	0,560	0,543
213719_s_at	SMARCA4	1,024	0,864	1,132	0,998
213720_s_at	SMARCA4	0,648	0,725	1,011	0,811
214360_at	SMARCA4	0,791	1,086	1,142	1,170
214728_x_at	SMARCA4	0,810	0,781	1,029	0,949
215714_s_at	SMARCA4	0,764	0,827	1,175	0,999
217656_at	SMARCA4	0,940	1,163	1,165	0,988
208991_at	STAT3	0,784	0,623	1,564	1,073
208992_s_at	STAT3	0,912	0,897	1,526	1,308
209151_x_at	TCF3	0,612	0,951	0,849	1,020
209152_s_at	TCF3	0,900	1,031	1,035	0,894
209153_s_at	TCF3	0,853	0,914	1,151	0,599
210776_x_at	TCF3	1,020	0,958	1,001	0,828
213730_x_at	TCF3	0,936	0,954	1,150	0,806
213731_s_at	TCF3	0,973	1,023	1,218	1,063
213732_at	TCF3	1,081	1,150	0,872	0,801
213809_x_at	TCF3	1,045	0,898	1,051	0,869
213811_x_at	TCF3	1,010	0,881	1,250	0,923
215260_s_at	TCF3	0,772	1,266	0,835	0,809
216645_at	TCF3	1,204	1,092	0,945	0,990
216647_at	TCF3	0,794	0,940	1,036	1,058
204849_at	TCFL5	1,537	1,522	0,725	0,427
214009_at	TMSB4X	0,889	1,017	1,210	1,171
201367_s_at	ZFP36L2	1,282	1,001	0,676	0,662
201368_at	ZFP36L2	2,078	0,777	1,022	0,738
201369_s_at	ZFP36L2	1,099	1,212	0,579	0,652
204523_at	ZNF140	1,062	0,951	1,205	1,395

Dargestellt sind die Ratios nach siRNA-Transfektion in HA1ER SCR-Scrambled, Ratios: **SCR**-HA1ER-SCR vs. HA1EB-SCR, **BLIND**-HA1ER BLIND vs. HA1EB-BLIND, **FRA1-1/2**- HA1ER FRA1-1/2 vs. HA1ER SCR

In den oben stehenden Tabellen **Tab. 4.12** und **Tab. 4.13** sind alle Annotationen zu den in **Abb. 4.24** dargestellten Genen aufgelistet.

Es ersichtlich, dass die Analyse, wie sie in **Abb. 4.24** dargestellt ist, die Regulation der Gene nur unzureichend wiedergibt, da jeweils nur eine einzige ID abgebildet wird. Hier werden zum Teil Regulationen suggeriert, die nicht für alle Annotationen des Gens auf dem Microarray zutreffen. Zum Beispiel sollte nach der GSEA-GO Analyse TCF3 herunterreguliert sein (**Abb. 4.24**). Allerdings zeigt der Vergleich mit den Expressionsdaten für die 12 Annotationen, dass lediglich eine (209151_x_at) durch die FRA1-Hemmung mit siRNA signifikant nach unten reguliert ist, und das auch nicht in HA1ER, sondern in HA1EB. Legt man einen statistischen Grenzwert von 1,5 für die minimale Änderung durch die siRNA-Behandlung im Microarray an, können zwar fast alle Gene als reguliert identifiziert werden, allerdings gilt dies oft nicht für alle Annotationen.

4.4.4 TRAP

Unter den in Kapitel 4.4.1 beschriebenen und analysierten Daten befinden sich neben den verschiedenen Transkriptionsfaktoren auch eine Reihe weiterer Gene, die FRA1-abhängig reguliert werden. Aufgrund des langen Zeitraums der siRNA-Inkubation ist davon auszugehen, dass sich unter den regulierten Genen sowohl direkte, als auch indirekte Zielgene der Transkriptionsfaktoren befinden. Um diese voneinander zu trennen, wurde die TRAP (TRanscription factor Affinity Prediction) angewandt. Dabei wurde zunächst im unmittelbaren Bereich vor und nach dem ATG des Gens (-/+200bp) nach Bindestellen für SRF, FRA1 (AP1) und ELK3 gesucht. Wurde dort keine Anreicherung gefunden, wurde dieser Bereich bis zu den nächsten AP1-Bindestellen erweitert. In die Analyse flossen alle auf dem Array annotierten IDs ein, sortiert nach Expressionsunterschied siRNA-Behandlung vs. SCR. In den Tabellen **Tab. 14 A** und **B** sind die Ergebnisse der TRAP-Analyse für die AP1-Bindesequenzmatrix dargestellt. Die Tabellen **Tab. XII** und **Tab. XIII** des An-

hangs zeigen die Ergebnisse der TRAP Analyse für die SRF (CarG-Box)- und ETS-Bindesequenzmatrizen und werden hier noch einmal zusammenfassend dargestellt.

FRA1

Die TRAP-Analyse für die FRA1-spezifischen Daten und die AP1-Bindesequenz zeigen in HA1EB eine Überrepräsentation von histoncodierenden Genen (HIST1, HIST2) sowie von immunresponsiven Genen (IFI6, IFIT1, OAS1, OAS2, OASL, SP110), welche durch die FRA1-siRNA-Hemmung aufreguliert werden. Bei den herunterregulierten Genen gibt es eine deutliche Überrepräsentation von IDs für PAX8, einen Transkriptionsfaktor, der an Differenzierungsprozessen beteiligt ist (Stuart et al. 1996).

Tab. 4.14: TRAP-Analyse der differentiell aufregulierten Gene („transcription factor activity“) in FRA1-siRNA-behandelten HA1EB

ID	Symbol	P-Wert	SCR	BLIND	FRA1-1	FRA1-2
208579_x_at	H2BFS	3,17E-02	0,692	0,257	9,293	15,704
219863_at	HERC5	2,74E-02	0,772	0,044	4,030	4,473
215071_s_at	HIST1H2AC	3,53E-02	0,849	0,392	7,106	5,327
208527_x_at	HIST1H2BE	3,39E-02	0,759	0,483	2,905	5,070
208490_x_at	HIST1H2BF	4,86E-02	0,693	0,912	2,133	5,194
208546_x_at	HIST1H2BH	3,33E-02	1,029	0,637	5,784	5,937
209806_at	HIST1H2BK	8,31E-03	0,811	0,146	14,464	20,869
214290_s_at	HIST2H2AA3	2,92E-02	1,942	0,416	8,141	4,350
218280_x_at	HIST2H2AA3	4,73E-02	1,013	0,606	5,597	2,368
204415_at	IFI6	3,57E-02	0,190	0,014	11,947	3,753
203153_at	IFIT1	3,36E-02	0,491	0,004	6,738	3,813
205483_s_at	ISG15	4,25E-02	0,647	0,021	5,290	3,415
205552_s_at	OAS1	4,94E-02	0,179	0,005	11,588	4,607
204972_at	OAS2	3,58E-02	0,294	0,034	10,368	3,967
205660_at	OASL	3,42E-02	0,913	0,024	9,106	3,610
213797_at	RSAD2	2,59E-02	0,461	0,012	22,908	21,931
212438_at	RY1	1,75E-02	2,702	1,828	2,739	3,828
212440_at	RY1	4,26E-02	1,740	1,661	1,983	4,430
204035_at	SCG2	1,00E-02	23,446	8,971	3,157	3,704
208012_x_at	SP110	8,66E-03	0,876	0,145	3,654	4,142
206613_s_at	TAF1A	2,85E-02	1,839	0,908	2,081	6,160

Dargestellt sind die Ratios der Gene, die mit höchster Expressionsänderung FRA1-abhängig reguliert waren und über eine FRA1-Bindestelle verfügen. Ratios: **SCR**- HA1ER-SCR vs. HA1EB SCR, **BLIND**- HA1ER BLIND vs. HA1EB BLIND, **FRA1-1**- HA1EB FRA1-1 vs. HA1EB-SCR, **FRA1-2**- HA1EB FRA1-2 vs. HA1EB-SCR.

Tab. 4.15: TRAP-Analyse der differentiell abregulierten Gene („transcription factor activity“) in FRA1-siRNA-behandelten HA1EB

ID	Symbol	P-Wert	SCR	BLIND	FRA1-1	FRA1-2
213182_x_at	CDKN1C	1,63E-02	0,368	0,791	0,195	0,067
213348_at	CDKN1C	3,75E-02	0,432	0,980	0,333	0,098
216894_x_at	CDKN1C	2,21E-02	0,443	1,195	0,254	0,082
219534_x_at	CDKN1C	2,01E-02	0,381	0,993	0,236	0,066
206336_at	CXCL6	2,40E-02	0,071	0,212	0,112	0,007
217838_s_at	EVL	1,55E-02	0,192	0,495	0,373	0,156
205381_at	LRRC17	7,70E-03	1,899	2,613	0,202	0,078
121_at	PAX8	1,58E-02	1,413	1,146	0,608	0,361
207921_x_at	PAX8	8,17E-03	1,034	1,795	0,313	0,173
207923_x_at	PAX8	1,12E-02	1,003	1,720	0,324	0,154
207924_x_at	PAX8	1,60E-02	1,023	1,901	0,289	0,139
209552_at	PAX8	7,13E-03	1,102	1,099	0,328	0,173
214528_s_at	PAX8	1,85E-02	1,280	1,919	0,292	0,071
203895_at	PLCB4	3,42E-02	0,465	1,268	0,115	0,302
203896_s_at	PLCB4	1,99E-02	0,713	3,214	0,134	0,308
208607_s_at	SAA2	3,61E-03	0,050	0,691	0,132	0,053
214456_x_at	SAA2	2,80E-03	0,043	0,546	0,105	0,040
200831_s_at	SCD	3,69E-02	1,913	3,130	0,432	0,155
200832_s_at	SCD	4,94E-02	1,294	1,962	0,332	0,018
203083_at	THBS2	4,62E-02	1,974	3,859	0,482	0,076
201645_at	TNC	4,56E-02	0,533	0,482	0,457	0,076

Dargestellt sind die Ratios der Gene, die mit höchster Expressionsänderung FRA1-abhängig reguliert waren und über eine FRA1-Bindestelle verfügen. Ratios: **SCR**- HA1ER-SCR vs. HA1EB SCR, **BLIND**- HA1ER BLIND vs. HA1EB BLIND, **FRA1-1**- HA1EB FRA1-1 vs. HA1EB-SCR, **FRA1-2**- HA1EB FRA1-2 vs. HA1EB-SCR.

Tab. 4.16: TRAP-Analyse der differentiell abregulierten Gene („transcription factor activity“) in FRA1-siRNA-behandelten HA1ER

ID	Symbol	P-Wert	SCR	BLIND	FRA1-1	FRA1-2
206513_at	AIM2	1,80E-02	3,314	2,273	0,338	0,583
213428_s_at	COL6A1	2,33E-02	2,215	2,721	0,392	0,610
205583_s_at	CXorf45	1,65E-02	1,371	1,927	0,487	0,454
205584_at	CXorf45	2,26E-02	1,104	2,650	0,623	0,538
209365_s_at	ECM1	3,90E-02	0,370	0,620	0,537	0,473
205462_s_at	HPCAL1	1,38E-02	4,580	3,536	0,392	0,608
212552_at	HPCAL1	5,14E-03	5,431	2,763	0,517	0,557
218729_at	LXN	3,53E-02	2,045	3,856	0,256	0,584
210010_s_at	SLC25A1	1,26E-02	0,981	1,188	0,610	0,479
218494_s_at	SLC2A4RG	2,81E-02	1,257	1,672	0,608	0,492
212282_at	TMEM97	3,48E-02	0,847	0,697	0,357	0,603

Dargestellt sind die Ratios der Gene, die mit höchster Expressionsänderung FRA1-abhängig reguliert waren und über eine FRA1-Bindestelle verfügen. Ratios: **SCR**- HA1ER-SCR vs. HA1EB SCR, **BLIND**- HA1ER BLIND vs. HA1EB BLIND, **FRA1-1**- HA1EB FRA1-1 vs. HA1EB-SCR, **FRA1-2**- HA1EB FRA1-2 vs. HA1EB-SCR.

Im Vergleich zu den TRAP-Analysen in den immortalen HA1EB-Zellen fällt auf, dass bei der Analyse der RAS-transformierten HA1ER-Zellen keine Anreicherung spezifischer biologischer Funktionen identifiziert werden kann. Die regulierten Gene können zwar zum Teil der extrazellulären Matrix bzw. Zelloberfläche (COL6A1, ECM1) und der Regulierung von Signalwegen zugeordnet werden (SLC2A4RG, HPCAL1), eine deutliche Überrepräsentation von Funktionen ist jedoch aufgrund der kleinen Anzahl von FRA1-abhängig regulierten Genen nicht möglich.

SRF

Unter den durch TRAP definierten direkten positiven und negativen Zielgenen von SRF in HA1EB (**Anhang Tab. XII A und B**) befinden sich neben dem Tumormarker CD44 auch Strukturgene der extrazellulären Matrix (COL6A3) sowie Faktoren, die an der Immunantwort (SAA2), der Transkription (ETV1) sowie der Regulierung von Signalkaskaden (DUSP10) beteiligt sind.

Im Vergleich dazu zeigt die TRAP-Analyse der SRF-Bindesequenzen in den HA1ER-Zellen (**Anhang Tab. XII C und D**) nach Hemmung von SRF mittels siRNA ein anderes Bild. Hier werden zwar Gene reguliert, die bereits zum Teil als SRF-Zielgene beschrieben wurden (ANXA1), die meisten sind jedoch bisher nicht als SRF-Zielgene identifiziert worden. Die identifizierten SRF-Zielgene decken verschiedene Funktionen ab, so Gene mit einer Rolle in der Tumorgenese (MTA1), mitochondriale Gene (BCL10), sowie proteinmodifizierende Gene (UFM1).

ELK3

Die Datenanalyse der ELK3-siRNA-Experimente für HA1EB (**Anhang Tab. XIII A und B**) war mit Schwierigkeiten behaftet. Obwohl vor der Affinitätsanalyse gegenüber der ETS-Bindesequenzmatrix eine Rangliste der Gene nach ihrer Expressionsänderung siRNA-Behandlung vs. SCR erstellt wurde, mit der dann weitergearbeitet wurde, ist das Bild der in HA1EB identifizierten direkten Zielgene von ELK3 nicht ein-

heitlich. Bei verschiedenen Genen ist nicht die Regulierung ersichtlich, die in der TRAP-Analyse vorausgesetzt wurde. Stattdessen tauchen einige aufregulierte Gene in den Listen der abregulierten auf und umgekehrt. Einerseits lässt sich dies dadurch erklären, dass einige der betroffenen Gene durch mehrere IDs repräsentiert werden die, wie im Bsp. DNAJB4 entgegengesetzte Regulierungen zeigen. Andererseits tritt das beschriebene Phänomen auch bei Genen auf, die lediglich durch eine einzige ID repräsentiert werden. Es konnte keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden. Daher ist die TRAP-Analyse hier nicht interpretierbar.

In den RAS-transformierten HA1ER-Zellen konnte die Analyse eindeutig für die Daten der siRNA vermittelten ELK3-Hemmung durchgeführt werden. In dem Datenset der siRNA-abhängig aufregulierten Gene (**Anhang Tab. XIII**) konnte keine Anreicherung spezifischer Funktionalitäten festgestellt werden. Keines der hier dargestellten Gene ist bisher genauer als RAS oder ELK3-Zielgen identifiziert worden. Dagegen zeigt das Datenset der siRNA-abhängig abregulierten Gene eine deutliche Anreicherung strukturebender Gene (COL6A1, COL13A1, CXCL6). Interessanterweise wird durch die Hemmung von ELK3 auch NPAS2 in seiner Expression vermindert, das auch als FRA1-Zielgen identifiziert wurde.

4.4.5. Weitere Transkriptionsfaktoren

Neben SRF, FRA1 und ELK3 binden noch eine Reihe weiterer Regulatoren an die Promotoren der Zielgene. Im Zusammenhang mit der Aufklärung der transkriptionellen Netzwerke unterhalb von RAS-ERK stellte sich die Frage, ob diese in den beiden Zelllinien HA1EB und HA1ER für die einzelnen Zielgene unterschiedlich sind und ob mögliche Rückschlüsse auf die Struktur des transkriptionellen Netzwerks gezogen werden können. Zur Identifizierung von Regulatoren wurde eine Kombination von GSEA und TRAP-Analyse verwendet. Mittels TRAP lassen sich die identifizierten Zielgene von SRF, ELK3 und FRA1 auch auf Anreicherungen anderer Bindematrizen untersuchen. Die GSEA-Analyse kann einen literaturbasierten Hinweis darauf geben, ob identifizierte Zielgene von FRA1, SRF und ELK3 im Zusammenhang mit

anderen Transkriptionsfaktoren auftreten. Führt man die Erkenntnisse beider Analysen zusammen ist es möglich, einen begründeten Hinweis auf weitere regulierende Faktoren zu finden, die gegebenenfalls RAS-abhängig die Zielgenpopulationen in ihrer Expression beeinflussen.

Tab. 4.17: TRAP - Identifizierung weiterer Transkriptionsfaktorbindematrizen an Promotern von SRF, FRA1 und ELK3 Zielgenen in HA1EB und HA1ER

	siRNA-Hemmung	angereicherte Bindematrizen in siRNA-abh. aufregulierten Genen	angereicherte Bindematrizen in siRNA abh. abregulierten Genen
A HA1EB	SRF	CEBP, ETS, IPF1, IRF, HNF4, HSF1, PU1, STAT1, TCF11, STAT5A,	NFKB, SRF
	FRA1	IRF, IRF1, IRF7, ISRE, OCT, POU3F2	NFKB, CREL, TATA, AREB6, MEF2
	ELK3	AP1, IRF	NFKB, AP2, P53, SP1
B HA1ER	SRF	IRF1, NKX3A, HIF1	ALPHACP1, NFY, AP2, EGR1, NGFIC, EGR2, ZIC
	FRA1	EVI1, FOXO3A, FOXP1, PITX2, CEBP, FOXO1	AP1, SP1, WT1, SP1, IRF7
	ELK3	LUN1, PAX3, PAX6, SRF, STAT1	AP1, NFKB, BACH1, BACH2, WT1

Dargestellt sind Bindematrizen weiterer Transkriptionsfaktoren, die an Promotoren von Genen gefunden wurden, die durch siRNA-Hemmung von SRF, ELK3 und FRA1 transkriptionell reguliert wurden. Die TRAP-identifizierten Transkriptionsfaktoren können über GSEA in einen funktionellen Zusammenhang mit den entsprechenden Zielgenen gebracht werden.

In allen Datensets von HA1EB wurden Anreicherungen für die Stressantwortregulatoren NFKB sowie Interferon-regulierende-Faktoren (IRF) gefunden. Diese sind in den Datensätzen von HA1ER unterrepräsentiert. Lediglich für die ELK3 Datensätze wird auch NFKB als regulierender Faktor identifiziert. Im Gegensatz dazu finden sich in den Datensätzen der RAS-transformierten HA1ER-Zellen Anreicherungen für die differenzierungs- und proliferationssteuernden Transkriptionsfaktoren der PAX- und FOXO- Familie sowie für die Mitglieder des AP1-Komplexes. Neben diesen gibt es Anreicherungen für SP1, EGR1, AREB6, STAT1 und HIF1. Bis auf ZIC, PITX2 und NGFIC sind alle gefundenen Gene in den RAS-transformierten Zellen bereits mit onkogenen Prozessen bzw. RAS-abhängiger Transformation beschrieben worden.

4.4.6 Zielgene der FRA1-abhängigen Transkription

Aus den in Kapitel 4.4.5 vorgestellten bioinformatischen Analysen wurden potentielle direkte und indirekte Zielgene sowie zusätzlich regulierende Faktoren zusammengestellt, deren Regulation validiert werden sollte. Dabei wurden die zu validierenden Gene folgendermaßen ausgewählt: In den GSE-GO-Analysen wurde eine Reihe FRA1-abhängiger Transkriptionsfaktoren ermittelt (**Abb. 4.24**). Diese überlappen zum Teil mit den Daten der siRNA-Experimente anderer Transkriptionsfaktoren (NPAS2, ELK3). Daher habe ich mich auf diese Gruppe von Genen konzentriert. Hinzu kamen Gene, deren Regulationen in der RAS-vermittelten Transformation eine Rolle spielen (ECM1, ECM2, COL6A1, CDC42) sowie AREB6 und E2F als mögliche beteiligte zusätzliche Regulatoren der FRA1-anhängig gesteuerten Gene, wie sie durch GSEA und GO ermittelt wurden (Kapitel 4.4.6).

Die Validierung der potentiellen Zielgene erfolgte zunächst durch qPCR (Taqman). Um zu überprüfen, ob es sich bei den Zielgenen, wie durch TRAP ermittelt, um direkte FRA1-Zielgene handelt, wurde für einzelne dieser Gene eine ChIP (Chromatinimmunopräzipitation) durchgeführt. Die Validierung der direkten Regulation durch andere beteiligte Transkriptionsfaktoren konnte jedoch aufgrund der begrenzten Zeit und der ungenügenden Qualität der getesteten Antikörper (ELK3, SRF) nicht durchgeführt werden.

In Tabelle **Tab. 4.18** sind die getesteten Gene zusammengefasst. Dargestellt sind die Expressionsänderungen der Gene nach siRNA-Behandlung der HA1EB und HA1ER-Zellen im Vergleich zur SCR-Kontrolle (gelb: keine Änderung, grün: Abregulierung nach siRNA-Behandlung, rot: Aufregulierung nach siRNA-Behandlung). Im Vergleich dazu sind hier ebenfalls grob die Ergebnisse der Validierungen in qPCR (0: keine Änderung der Expression, -: Abregulierung, +/- nicht verifizierbare Ergebnisse in den Wiederholungen) und ChIP (- keine Anreicherung, +: Anreicherung) gezeigt.

Zusätzlich zu den in **Tab. 4.18** abgebildeten Genen wurden in der ChIP CCND1 und VEGF, zwei gut charakterisierte Zielgene der FRA1-abhängigen Transkription als Positivkontrollen etabliert.

Tab. 4.18: Zusammenfassung Zielgenvalidierung

SYMBOL	P-Wert		Microarray					Validierung		
	HA1EB	HA1ER	HA1EB			HA1ER		HA1EB	HA1ER	ChIP
			BLIND	FRA1-1	FRA1-2	FRA1-1	FRA1-2			
AEBP1	0,289	0,018	+	0	-	-	-	+/-	-	+
AREB6	0,108	0,503	+	+	+	+	+			
CDC42	0,7831	0,9673	-	0	0	+	+	+/-	+/-	-
COL6A1	0,670	0,171	0	-	-	-	0	0	0	-
CXCL6	0,0240	0,6530	-	-	-	0	+	0	-	+
E2F1	0,0260	0,5729	+	0	0	0	0	0	0	.
ECM1	0,056	0,039	-	-	-	-	-	0	0	
ECM2	0,2306	0,6523	-	+	0	0	0	-	-	
EFNA1	0,0197	0,1245	0	-	-	+	+	+/-	+/-	
ETV1	0,1777	0,5770	+	0	0	-	0	0	-	
FOSL1	0,394	0,014	+	0	-	-	-	-	-	+
FOXL1	0,2498	0,0413	+	0	0	0	0	0	-	-
FOXO3A	0,191	0,546	0	-	-	-	-	-	-	-
HIF1alpha	0,1744	0,3273	+	-	0	-	0	0	0	
HMGA1	0,9720	0,0134	+	0	0	-	-	+/-	+/-	
HMGA2	0,720	0,595	0	+	+	0	+	-	-	
NPAS2	0,053	0,042	+	-	-	-	-	0	-	
OAS1	0,0792	0,7058	-	+	+	-	-	0	0	-
OAS2	0,0358	0,3538	-	+	+	-	-	0	+	-
OASL	0,0342	0,7721	-	0	+	-	-	0	0	
PAX8	0,016	0,335	+	-	-	-	-	-	+/-	
PCGF2	0,6793	0,2954	0	0	0	0	0	+/-.	+	
RASSF1	0,0484	0,4541	-	0	0	0	0	+/-.	+/-	
SLC2A4R1	0,0826	0,0281	+	0	0	0	0	-	-	
SMARCA4	0,4237	0,6342	-	0	0	0	0	0	+/-	
SOX4	0,055	0,964	-	-	-	-	+	+/-	+/-	
SP1	0,157	0,300	-	+	+	+	+	-	-	-
SP110	0,0087	0,9914	-	+	+	0	0			
STAT3	0,1392	0,1535	-	+	0	+	0	0	0	-
TCF3	0,0054	0,7069	0	0	0	0	0	0	0	-
TCFL5	0,585	0,036	+	0	-	-	-	-	-	+
WEE1	0,143	0,054	0	+	+	+	+	0	0	
YWHAZ	0,499	0,004	0	0	-	+	+	0	0	+

Ratios: BLIND: HA1ER-BLIND vs. HA1EB BLIND, HA1EB FRA1-1/2: HA1EB FRA1-1/2 vs. HA1EB-SCR, HA1ER FRA1-1/2: HA1ER FRA1-1/2 vs. HA1ER-SCR. Validierung qPCR: HA1EB: HA1EB-FRA vs. HA1EB-SCR, HA1ER: HA1ER-FRA1 vs. HA1ER-SCR.

Optimierung des PCR-Nachweises für die ChIP

Mit Ausnahme von WEE1 sind für alle direkt untersuchten Gene AP1- Bindestellen identifizierbar. Diese wurden von Szymon Kielbasa (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik) den entsprechenden Bereichen im Promoter bzw. in Exon- und Intronbereichen zugeordnet (**Tab. 3.13**). Die Primer zur Amplifizierung der ChIP-DNA wurden für einen Bereich um die AP1-Bindestellen selektiert. VEGFR und CCND1 wurden als Positivkontrollen verwendet (Casalino et al. 2003, Diaz et al. 2000). In den Etablierungs-PCRs, die in **Abb. 4.25** dargestellt sind, wird ersichtlich, dass nicht alle Primerpaare etabliert sind und daher nicht alle möglichen AP1-Bindestellen nachgewiesen werden konnten.

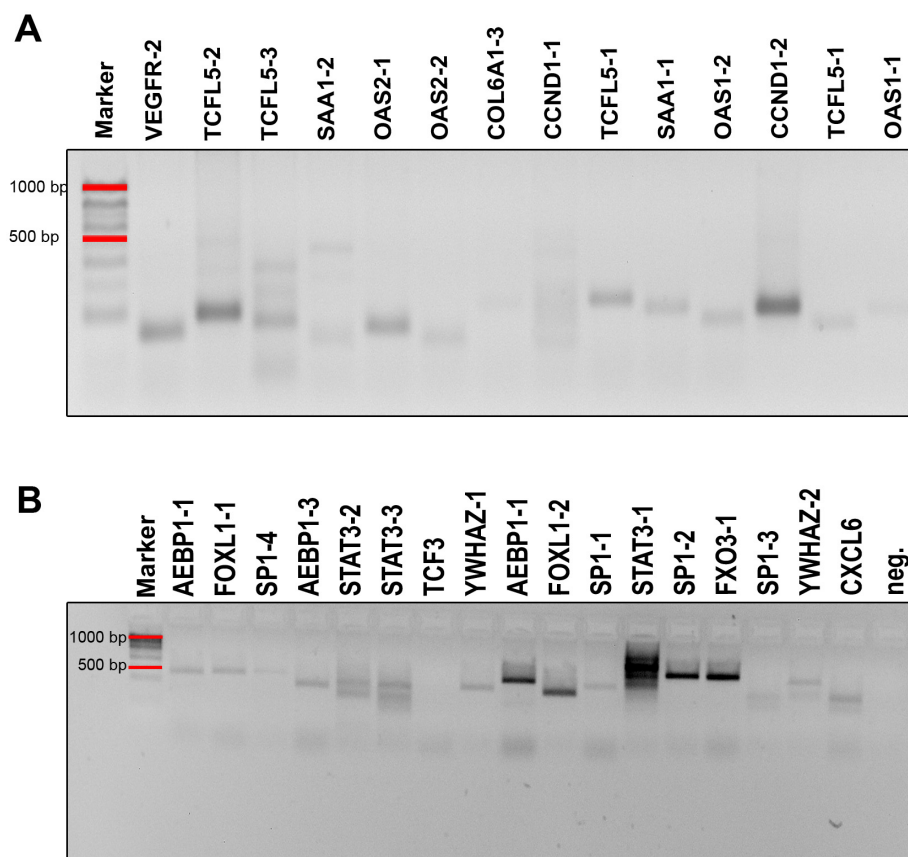


Abb. 4.25: Etablierung der PCR-Bedingungen zur Amplifikation genspezifischer AP1-Bindestellen für die oben angegebenen Gene

Die PCRs wurden nach Standardbedingungen (Kapitel 3) mit 200 ng genomischer DNA durchgeführt.

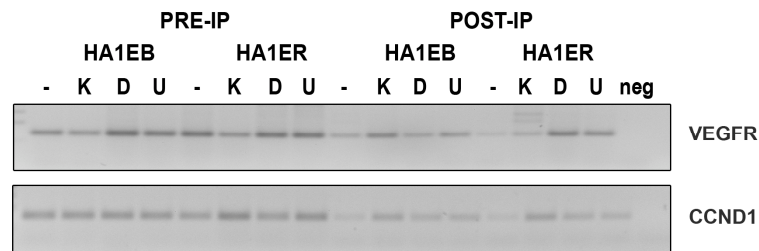


Abb. 4.26: PCR der Positivkontrollen CCND1 und VEGFR für die FRA1-spezifische ChIP

Kontroll-IP ohne Antikörper, K- Kontrolle, D-DMSO (48 h), U-U0126 [10 mM] (48 h). PCRs wurden nach Standardbedingungen (Kapitel 3) mit 200 ng genomischer DNA durchgeführt.

In **Abb. 4.26** sind die beiden Positivkontrollen der ChIP abgebildet. Zusätzlich zum Vergleich unbehandelter HA1EB und HA1ER Zellen wurde mittels U0126-Behandlung eine mögliche Änderung der ChIP-Anreicherung nach MEK-ERK-Hemmung untersucht.

FRA1-Zielgene

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Verifizierungsexperimente (qPCR und ChIP) für die potentiellen FRA1-Zielgene dargestellt, die in der GSEA-GO-Analyse (Kapitel 4.4.3) identifiziert wurden. Die Regulierungen in den beiden Microarrayanalysen (MEK-Inhibition und FRA1-siRNA-Behandlung) sind in **Tab. 4.19** und **Tab. 4.20** aufgeführt.

Tab. 4.19: Expressionsregulierung differentiell regulierter Gene der GSEA-GO- und TRAP-Analyse, die Verifizierungsexperimenten mittels qPCR und ChIP unterzogen wurden

SYMBOL	ID	MEK-Inhibition			siRNA-vermittelte FRA1-Hemmung						
		P-Wert		Ratio	P-Wert		Ratio				
		Kontrolle	Kontrolle		HA1EB	HA1ER	BLIND	HA1EB FRA1-1	HA1EB FRA1-2	HA1ER FRA1-1	HA1ER FRA1-2
AEBP1	201792_at	3,59E-19	1,46	1,03	0,29	0,02	1,67	1,05	0,58	0,35	0,50
FOSL1	204420_at	1,93E-15	2,56	0,37	0,39	0,01	1,53	1,08	0,62	0,13	0,32
FOXL1	216572_at	7,23E-16	0,99	1,12	0,25	0,04	1,52	1,00	0,88	0,86	0,73
HMGA1	206074_s_at	4,57E-15	7,42	0,19	0,97	0,01	1,93	0,93	1,01	0,30	0,45

Kontrolle: HA1ER-K vs. HA1EB-K, HA1EB/R: HA1EB/R-FRA1 vs. SCR, BLIND: HA1ER-BLIND vs. HA1EB-BLIND HA1EB/R-FRA1 -1/2 – HA1EB/R-FRA1-1/2 vs. SCR

Tab. 4.20: Fortsetzung Expressionsregulierung differentiell regulierter Gene der GSEA-GO- und TRAP-Analyse, die Verifizierungsexperimenten mittels qPCR und ChIP unterzogen wurden

SYMBOL	ID	MEK-Inhibition			siRNA-vermittelte FRA1 -Hemmung						
		P-Wert	Ratio		P-Wert		Ratio				
		Kontrolle	Kontrolle	U0126	HA1EB	HA1ER	BLIND	HA1EB FRA1-1	HA1EB FRA1-2	HA1ER FRA1-1	HA1ER FRA1-2
HMGA1	210457_x_at	4,57E-15	4,40	0,17	0,12	0,02	2,11	0,45	0,39	0,27	0,51
NPAS2	205459_s_at	1,63E-14	1,40	0,51	0,05	0,04	6,61	0,67	0,61	0,39	0,70
	205460_at	4,57E-15	2,01	0,38	0,28	0,39	7,14	0,84	0,77	0,50	1,03
	213462_at	1,63E-14	5,28	0,23	0,41	0,21	8,45	1,21	1,23	0,55	0,70
	39549_at	1,63E-14	3,78	0,22	0,90	0,48	5,33	0,93	1,04	0,45	0,93
PAX8	121_at	2,48E-15	1,70	0,55	0,02	0,33	1,15	0,61	0,36	0,51	0,67
	207921_x_at	2,48E-15	1,13	0,58	0,01	0,41	1,79	0,31	0,17	0,50	0,69
	207923_x_at	4,57E-15	1,34	0,46	0,01	0,22	1,72	0,32	0,15	0,50	0,63
	207924_x_at	2,48E-15	1,22	0,39	0,02	0,21	1,90	0,29	0,14	0,46	0,61
	209552_at	2,48E-15	1,42	0,37	0,01	0,22	1,10	0,33	0,17	0,34	0,53
	213917_at	7,23E-16	0,99	0,82	0,03	0,42	1,59	0,76	0,70	0,53	0,55
	214528_s_at	2,48E-15	1,60	0,35	0,02	0,36	1,92	0,29	0,07	0,42	0,63
	221990_at	1,93E-15	1,28	0,71	0,02	0,04	0,97	0,45	0,24	0,54	0,74
	203792_x_at	7,28E-15	0,92	0,97	0,68	0,30	1,04	0,96	1,12	0,77	0,98
	203793_x_at	1,93E-15	1,08	1,00	0,79	0,13	0,99	1,28	0,70	0,93	0,72
SLC2A4RG	218494_s_at	7,28E-15	1,31	0,80	0,08	0,03	1,67	0,77	0,46	0,61	0,49
SMARCA4	208793_x_at	1,63E-14	0,88	0,87	0,42	0,63	0,77	1,13	1,05	1,24	1,00
	208794_s_at	3,59E-19	1,06	1,03	0,51	0,89	0,47	1,32	0,98	0,96	0,86
	212520_s_at	4,57E-15	0,89	0,96	0,83	0,49	0,74	1,11	0,94	0,56	0,54
	213719_s_at	1,93E-15	0,86	1,08	0,49	0,42	0,86	1,21	1,12	1,13	1,00
	213720_s_at	7,23E-16	0,96	1,17	0,89	0,61	0,73	1,28	0,82	1,01	0,81
	214360_at	4,57E-15	1,03	0,97	0,15	0,02	1,09	0,76	0,91	1,14	1,17
	214728_x_at	1,63E-14	0,91	1,03	0,52	0,81	0,78	1,08	1,03	1,03	0,95
	215714_s_at	4,57E-15	1,00	1,01	0,48	0,85	0,83	1,20	1,08	1,18	1,00
	217656_at	1,93E-15	0,98	0,85	0,32	0,62	1,16	1,13	1,02	1,17	0,99
	201416_at	7,23E-16	0,59	0,73	0,06	0,96	0,63	0,58	0,19	0,71	1,92
SOX4	201417_at	7,28E-15	0,47	0,68	0,06	0,64	0,66	0,60	0,23	0,98	2,40
	201418_s_at	4,57E-15	0,69	0,80	0,03	0,31	0,90	0,66	0,42	0,59	1,00
	213665_at	4,57E-15	0,86	1,00	0,13	0,56	0,91	0,93	0,91	1,04	1,04
	213668_s_at	3,59E-19	0,93	0,93	0,01	0,70	0,88	0,44	0,30	0,50	1,19
TCF3	209151_x_at	7,23E-16	0,88	1,16	0,01	0,71	0,95	0,58	0,58	0,85	1,02
	209152_s_at	4,57E-15	1,07	1,07	0,22	0,97	1,03	0,92	0,85	1,04	0,89
	209153_s_at	4,57E-15	1,15	1,11	0,28	0,41	0,91	1,06	0,58	1,15	0,60
	210776_x_at	4,57E-15	0,88	1,18	0,66	0,77	0,96	1,21	0,92	1,00	0,83
	213730_x_at	4,57E-15	0,93	1,13	0,39	0,81	0,95	1,41	0,94	1,15	0,81
	213731_s_at	1,63E-14	0,75	0,94	0,47	0,09	1,02	1,28	1,07	1,22	1,06
	213732_at	1,63E-14	1,01	0,97	0,40	0,24	1,15	1,13	1,12	0,87	0,80
	213809_x_at	4,57E-15	0,89	1,11	0,17	0,73	0,90	1,48	1,09	1,05	0,87
	213811_x_at	7,23E-16	0,94	1,18	0,35	0,68	0,88	1,30	0,98	1,25	0,92
	215260_s_at	4,57E-15	1,05	1,04	0,11	0,01	1,27	0,77	0,73	0,83	0,81
TCFL5	216645_at	4,57E-15	1,00	1,03	0,59	0,69	1,09	1,28	1,00	0,94	0,99
	216647_at	7,23E-16	1,10	0,92	0,26	0,48	0,94	0,87	0,79	1,04	1,06
	204849_at	4,57E-15	1,55	0,72	0,59	0,04	1,52	1,10	0,59	0,72	0,43

Kontrolle: HA1ER-K vs. HA1EB-K, HA1EB/R: HA1EB/R-FRA1 vs. SCR, BLIND: HA1ER-BLIND vs. HA1EB-BLIND HA1EB/R-FRA1-1/2: HA1EB/R-FRA1-1/2 vs. SCR

Die differentielle Expression und die FRA1-Bindung an diese Gene ist in den Abbildungen **Abb. 4.27-Abb. 4.33** dargestellt.

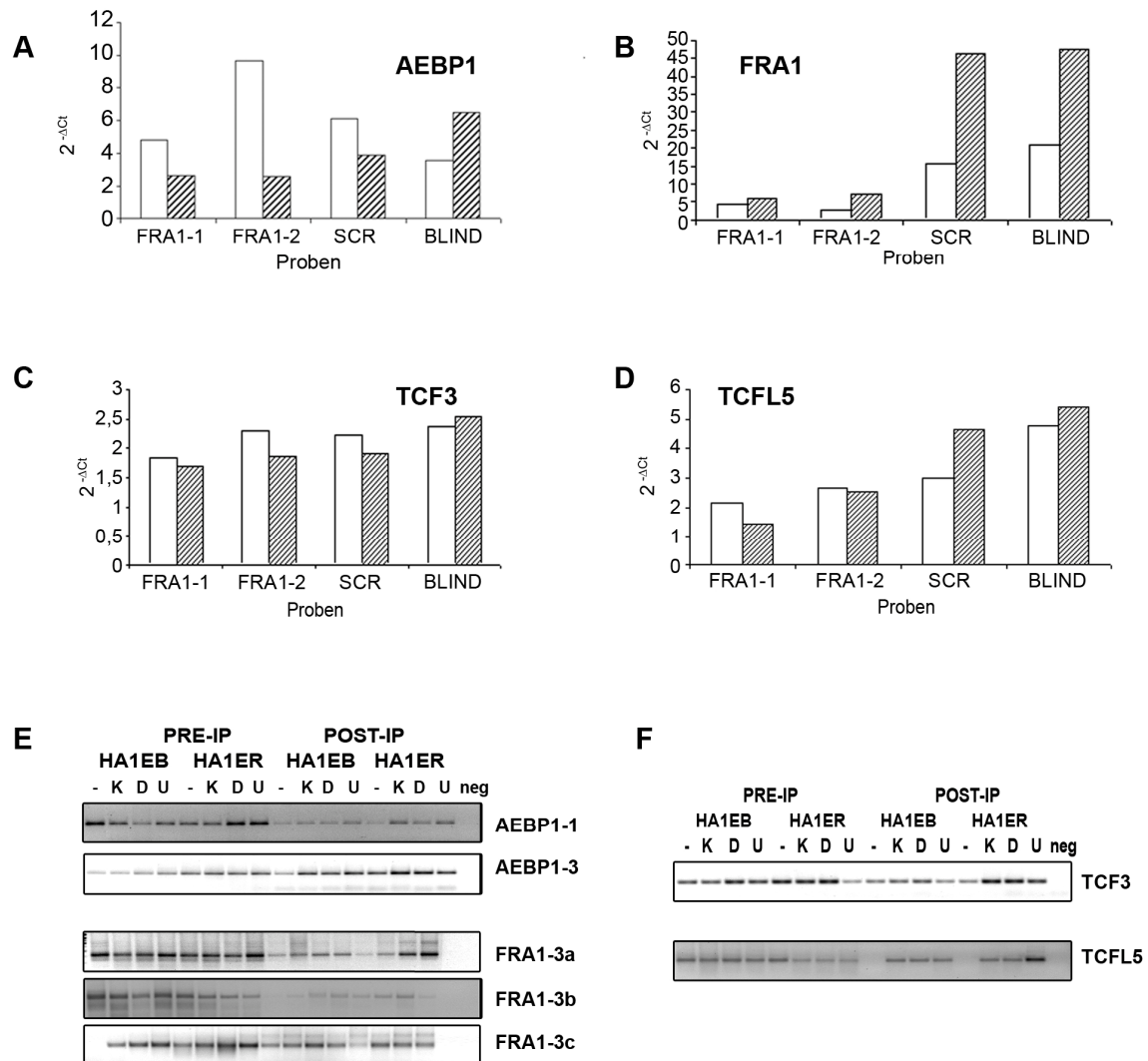


Abb. 4.27: Expressionsänderung nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung und FRA1-ChIP-Anreicherung von AEBP1, FRA1, TCF3 und TCFL5

A-D Validierungen der Regulation mittels qPCR (10 ng), **E-F** Validierungen der AP1-Bindestelle mittels ChIP. **A** qPCR AEBP1, **B** qPCR FRA1, **C** qPCR TCF3, **D** qPCR TCFL5. K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126 (10 μ M), \square HA1EB, \square HA1ER

Wie in **Abb. 4.27A** zu sehen, ist für AEBP1 eine deutliche Expressionsverminderung von AEBP1 nach siRNA-vermittelter FRA1-Inhibition in den HRAS-transformierten HA1ER-Zellen nachweisbar. In HA1EB ist keine FRA1-abhängige Regulierung zu sehen, gegen-

über der SCR-Kontrolle ist für die beiden Oligos sogar eine gegensätzliche Regulierung nach FRA1-Hemmung erkennbar. Dies ist auch in den Microarraydaten nachweisbar (**Tab. 4.19**). Für HA1EB widersprechen sich die Daten des Validierungsexperiments und des Microarrays. Während im Microarray eine Expressionsverminderung nach siRNA-Behandlung beobachtet wird (**Tab. 4.19**), wird im Validierungsexperiment eine Expressionsänderung gemessen (**Abb. 4.27A**). Aufgrund dessen kann AEBP1 als Zielgen von FRA1 in beiden Zelllinien nachgewiesen werden-die eindeutige Expressionsänderung durch FRA1 kann jedoch aufgrund der qPCR-Ergebnisse nur für die RAS-transformierten HA1ER-Zellen beschrieben werden.

Die eindeutige Anreicherung in der ChIP (**Abb. 4.27 E**) und die deutlichen Expressionsverminderung (**Abb. 4.27 B, Tab. 4.19**) nach der siRNA-Behandlung bestätigen FRA1 als positives Zielgen der RAS-abhängigen FRA1-vermittelten Transkription. Dies entspricht der gegenwärtigen Literaturlage. Damit kann FRA1 ebenfalls als Positivkontrolle von FRA1-ChIP-Experimenten angesehen werden.

Für TCF3 konnte in der qPCR (**Abb. 4.27 C**) keine eindeutige Regulation durch FRA1 nachgewiesen werden, obwohl FRA1 an den Promoter des Gens bindet (**Abb. 4.27 F**). Dies deckt sich mit den Daten des Microarrays (**Tab. 4.20**), die für einzelne IDs unterschiedlich sind und daher keine eindeutige Aussage zulassen. Daher kann zwar geschlossen werden, dass TCF3 FRA1 bindet, dieses jedoch nicht allein für die Expression des Gens ausschlaggebend ist. Andere Transkriptionsfaktoren, wie sie in der TRAP und GSEA-Analyse identifiziert worden sind (**Tab. 4.17**), könnten für die Transkriptionsregulation des Gens in Frage kommen.

TCFL5 konnte in beiden Zelllinien als positives Zielgen der FRA1-abhängigen Transkription bestätigt werden (**Abb. 4.27D und F**). Es kommt nach FRA1-Hemmung sowohl im Expressionsprofil, als auch in der Einzelanalyse zur Expressionsverminderung, wobei diese in HA1ER stärker als in HA1EB ist (**Abb. 4.27D**). In beiden Zellen ist zudem eine Anreicherung in der FRA1-ChIP am TCFL5 Promoter nachweisbar (**Abb. 4.27F**).

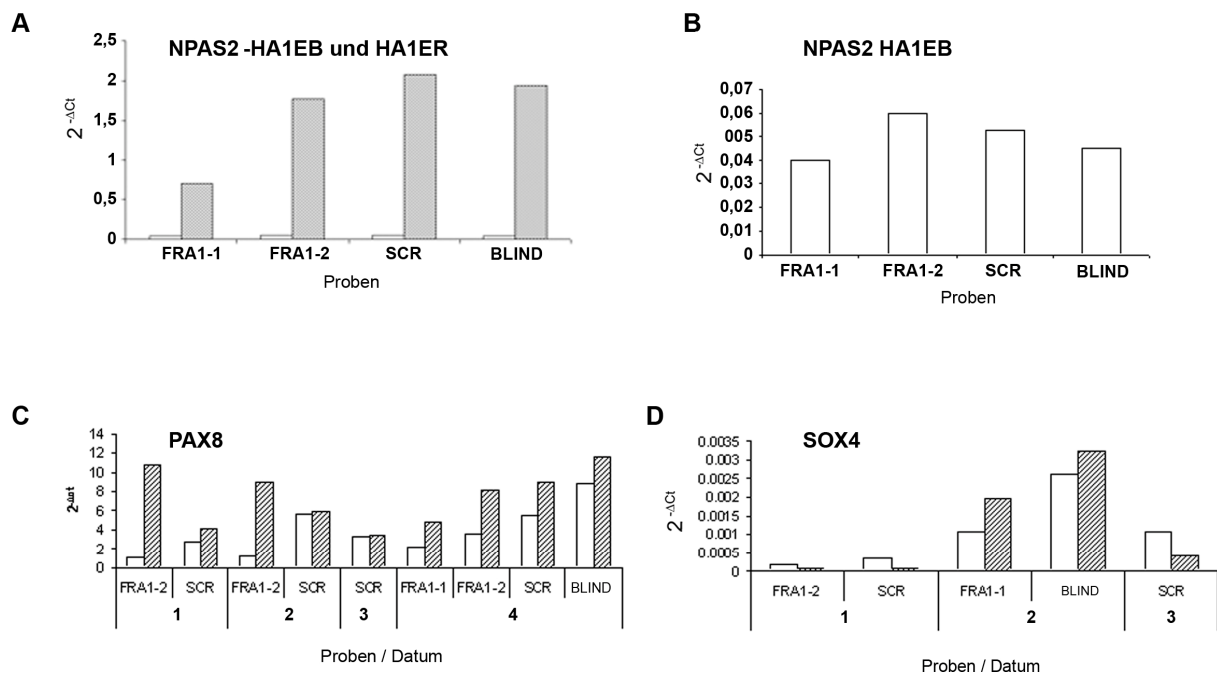


Abb. 4.28: Expressionsänderung von NPAS2, SOX4 und PAX8 nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung

Validierungen der Regulation mittels qPCR (10 ng). A NPAS2, B NPAS2-HA1EB C PAX8, D SOX4
 □ HA1EB ▨ HA1ER, 1-4 fortlaufende Wiederholungen der Experimente

NPAS2 konnte in den hier durchgeführten Analysen als stark RAS-abhängig reguliertes Gen bestätigt werden (**Abb. 4.28A und B**). Wie in den Microarrays beobachtet (**Tab. 4.20**), wurde eine Expressionserhöhung in HA1ER nachgewiesen. Das Gen ist durch die siRNA-vermittelte Hemmung von FRA1 beeinflussbar, jedoch zeigt sich hier ein starker Unterschied zwischen den beiden verwendeten Oligos. NPAS2 wird lediglich durch die FRA1-1-siRNA-Behandlung beeinflusst, bei dem Oligo FRA1-2 konnte keine signifikante Regulation beobachtet werden. Dies stimmt mit den gemessenen Microarrayexpressionen überein. Sämtliche genspezifischen IDs des Microarrays zeigen eine deutliche Expressionsverminderung nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass NPAS2 ein positives Zielgen der RAS-ERK-FRA1-vermittelten Transkription ist. NPAS2 verfügt über AP1-Bindestellen im Enhancerbereich des Gens. Eine mögliche Anreicherung konnte jedoch nicht gezeigt werden, da im Rahmen des Projektes keine PCR etabliert werden konnte.

Die Validierung von PAX8 erwies sich als schwierig. Aus den Analysen der Microarrays geht hervor, dass PAX8 ein Zielgen der FRA1-vermittelten Transkription sein müsste (**Tab. 4.20**). Allerdings zeigen die Verifizierungsexperimente lediglich in einem der Versuche eine entsprechende Regulierung (**Abb. 4.28C4**). PAX8 besitzt AP1-Bindestellen, eine direkte Bindung von FRA1 wurde jedoch im Rahmen des Projektes nicht nachgewiesen. Daher PAX8 ein nicht eindeutig als positives Zielgen von FRA1 nachgewiesen werden.

SOX4 konnte ebenfalls nicht als FRA1-Zielgen validiert werden. Hier zeigen die verschiedenen IDs von SOX4 im Microarray unterschiedliche Regulationen nach der FRA1-Hemmung (HA1EB und HA1ER, **Tab. 4.20**). Ebenso konnten keine einheitlichen Ergebnisse in den Verifizierungsexperimenten erzielt (**Abb. 4.28D**) werden.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Validierungsexperimente für die Gene FOXL1, PCGF2, SLC2A4RG und SMARCA4 zusammengefasst (**Abb. 4.29**). Die vier Gene wurden in der GSEA-GO-Analyse im Cluster der FRA1-abhängig regulierten Transkriptionsfaktoren gefunden. Allerdings zeigt lediglich SLC2A4RG auf dem Microarray eine deutliche Regulierung durch das Oligo FRA1-2 in HA1ER. PCGF2 und SMARCA4 werden lediglich in einzelnen genspezifischen IDs durch die FRA1-Hemmung beeinflusst, daher ist ein Gesamteffekt nicht abschätzbar. Die Verifizierung der Genexpression durch qPCR bestätigt dies. Lediglich FOXL1 und SLC2A4RG zeigen eine leichte Tendenz zur Expressionsverminderung nach FRA1-siRNA-Behandlung und könnten als mögliche Zielgene von FRA1 in Betracht gezogen werden. PCGF2 zeigt, wie auch SMARCA4, in allen Experimenten eine leichte Expressionserhöhung nach FRA1-Hemmung. Dies widerspricht den Microarraydaten. Die Transkriptionsfaktoren verfügen über AP1-Bindestellen, jedoch ist davon auszugehen, dass aufgrund der schwachen Regulierung durch FRA1 lediglich FOXL1 und SLC2A4RG als mögliche Zielgene in Betracht gezogen werden können. Da die Regulation nach der siRNA-vermittelten Hemmung von FRA1 jedoch auch bei diesen Genen nur gering ausfällt und keine CHIP-PCR von ihnen etabliert wurde, kann diese These nicht bestätigt werden.

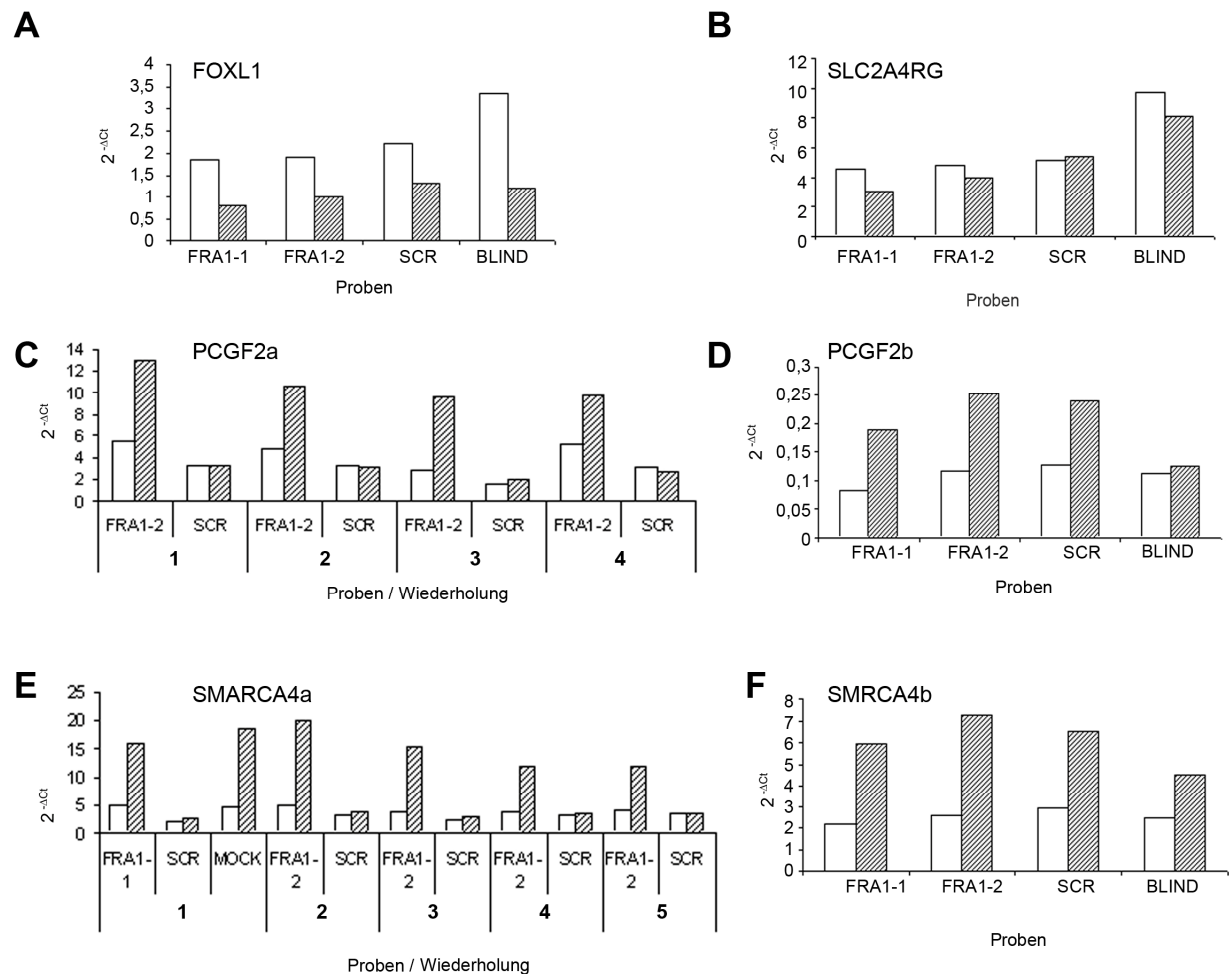


Abb. 4.29: Expressionsänderung von FOXL1, PCGF2, SLC2A4RG und SMARCA4 nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung

Validierungen der Regulation mittels qPCR (10 ng) A FOXL1, B SLC2A4RG, C PCGF2a, D PCGF2b, E SMARCA4a, F SMARCA4b. □ HA1EB ▨ HA1ER, 1-5 fortlaufende Wiederholungen der Experimente

Weitere GSEA und TRAP-identifizierte Transkriptionsfaktoren

Neben den Transkriptionsfaktoren aus der GSEA-GO-Analyse wurden auch andere Transkriptionsfaktoren auf eine mögliche Regulation durch FRA1 überprüft. Dazu gehörte HIF1alpha, der über TRAP als möglicher zusätzlicher Regulator der SRF-abhängigen Transkription identifiziert wurde. Daneben wurde der HMGA1-Verwandte HMGA2 überprüft, der ein bekanntes Zielgen der RAS-ERK-abhängigen Transkription und mit FRA1-abhängiger Regulation verbunden ist (Battista et al. 1998). Hinzu kamen das TRAP-identifizierte YWHAZ, ein Signalprotein der 14-3-3-Familie, das an Transkriptionsprozessen beteiligt ist, sowie STAT3 und ETV1. Diese beiden letzten

Gene wurden in der Schnittmengenanalyse zunächst als SRF-Zielgene identifiziert und sollten auf eine mögliche Beeinflussung durch FRA1 abgeklärt werden. Die Expressionsänderung nach FRA1-Hemmung und die Anreicherung in der FRA1-CHIP sind in den Abbildungen **Abb. 4.30** und **Abb. 4.31** bzw. in **Tab. 4.21** zusammengestellt.

Tab. 4.21: Expressionsänderung weiterer möglicher FRA1-abhängiger Transkriptionsfaktoren nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung in HA1EB und HA1ER

SYMBOL	ID	MEK-Inhibition		P-Wert		P-Wert		FRA1-Hemmung			
		P-Wert	Ratio	P-Wert	Ratio	P-Wert	Ratio	P-Wert	Ratio	P-Wert	Ratio
		Kontrolle	Kontrolle	U0126	HA1EB	HA1ER	BLIND	HA1EB FRA1-1	HA1EB FRA1-2	HA1ER FRA1-1	HA1ER FRA1-2
ETV1	206501_x_at	3,59E-19	1,21	0,83	0,18	0,58	1,54	1,37	1,23	0,84	1,03
	217053_x_at	4,57E-15	1,31	0,72	0,35	0,32	2,14	0,90	0,86	0,68	0,95
	217061_s_at	4,57E-15	1,27	0,83	0,90	0,48	1,47	1,00	1,06	0,70	1,09
	221910_at	7,28E-15	1,07	0,90	0,14	0,15	1,05	1,54	1,23	1,14	1,44
	221911_at	7,28E-15	3,07	0,20	0,45	0,48	2,63	1,43	1,11	0,46	1,42
HIF1alpha	200989_at	4,57E-15	1,06	1,04	0,17	0,33	1,31	0,61	0,85	0,49	0,99
HMGA2	208025_s_at	1,63E-14	11,43	0,16	0,72	0,59	1,19	1,87	1,35	1,16	3,25
YWHAZ	200641_s_at	4,57E-15	1,14	0,90	0,50	0,00	1,02	0,98	1,48	1,93	2,23
	200638_s_at	1,93E-15	1,52	0,88	0,34	0,01	0,83	1,23	1,51	1,78	2,04
	200640_at	7,23E-16	1,24	0,77	0,57	0,47	1,39	1,06	1,19	1,26	1,71
	200639_s_at	1,93E-15	1,16	0,84	0,01	0,09	1,10	1,38	1,61	1,66	1,81
STAT3	208991_at	4,57E-15	0,73	1,04	0,14	0,15	0,62	2,00	1,14	1,56	1,07
	208992_s_at	1,93E-15	0,87	0,78	0,15	0,03	0,90	1,68	1,25	1,53	1,31

Kontrolle: HA1ER-K vs. HA1EB-K, HA1EB/R: HA1EB/R-FRA1 vs. SCR, BLIND: HA1ER-BLIND vs. HA1EB-MOCK HA1EB/R-FRA1-1/2: HA1EB/R-FRA1-1/2 vs. SCR

Die Expression der in **Tab. 4.21** dargestellten Gene ist auf dem Microarray zum größten Teil nicht RAS-abhängig reguliert. Ausnahmen bilden ETV1 und STAT3 (**Abb. 4.30A und B**). Eine FRA1-abhängige Regulation konnte lediglich für HMGA1 und YWHAZ nachgewiesen werden. Die Validierung stimmt mit diesen Daten überein, allerdings tritt die FRA1 abhängige Regulation von HMGA1 nur in einem Experiment auf (**Abb. 4.31**). Daher kann die HMGA1-Regulation über FRA1 nicht bestätigt werden.

Die Expression von YWHAZ in HA1EB konnte nicht validiert werden. Es konnte allerdings eine starke ChIP-Anreicherung an der AP1-Bindesequenz des YWHAZ-Promoters in HA1EB nachgewiesen werden, daher ist YWHAZ ein mögliches Zielgen der FRA1-vermittelten Transkription in HA1EB.

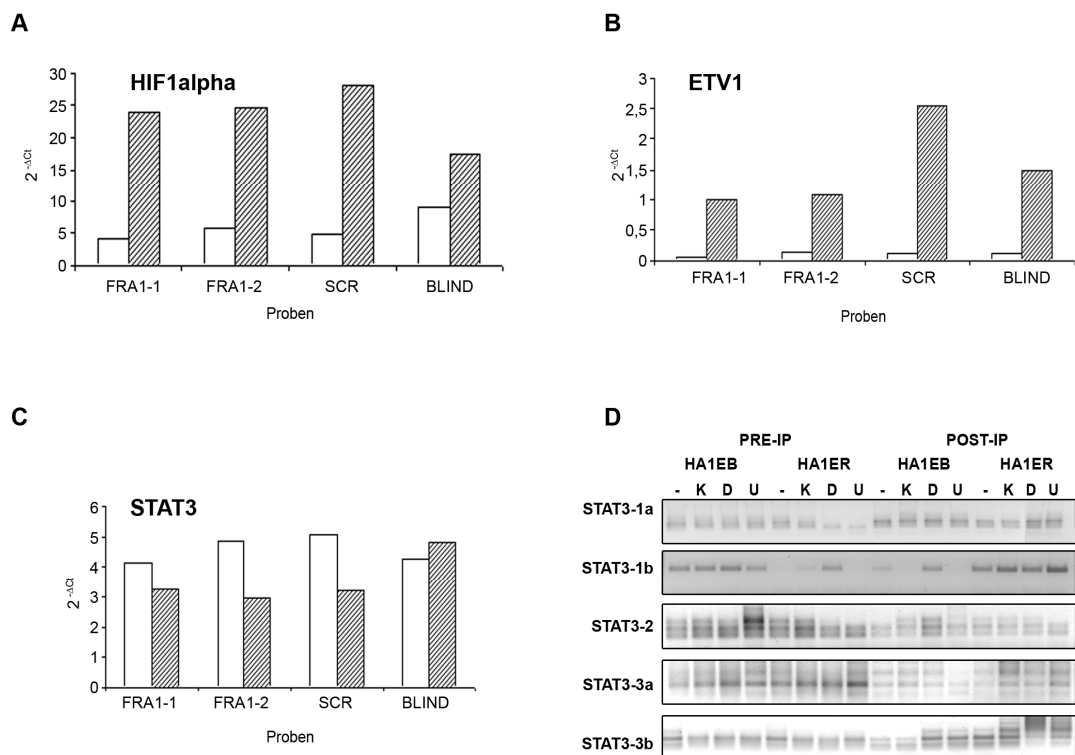


Abb. 4.30: Expressionsänderung von HIF1alpha, ETV1 und STAT3 nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung, sowie FRA1-ChIP-Anreicherung am STAT3-Promoter

Validierungen der Regulation mittels qPCR (10 ng) und ChIP. **A** qPCR HIF1alpha, **B** qPCR ETV1, **C** qPCR STAT3, **D** ChIP STAT3. K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126 □ HA1EB ▨ HA1ER

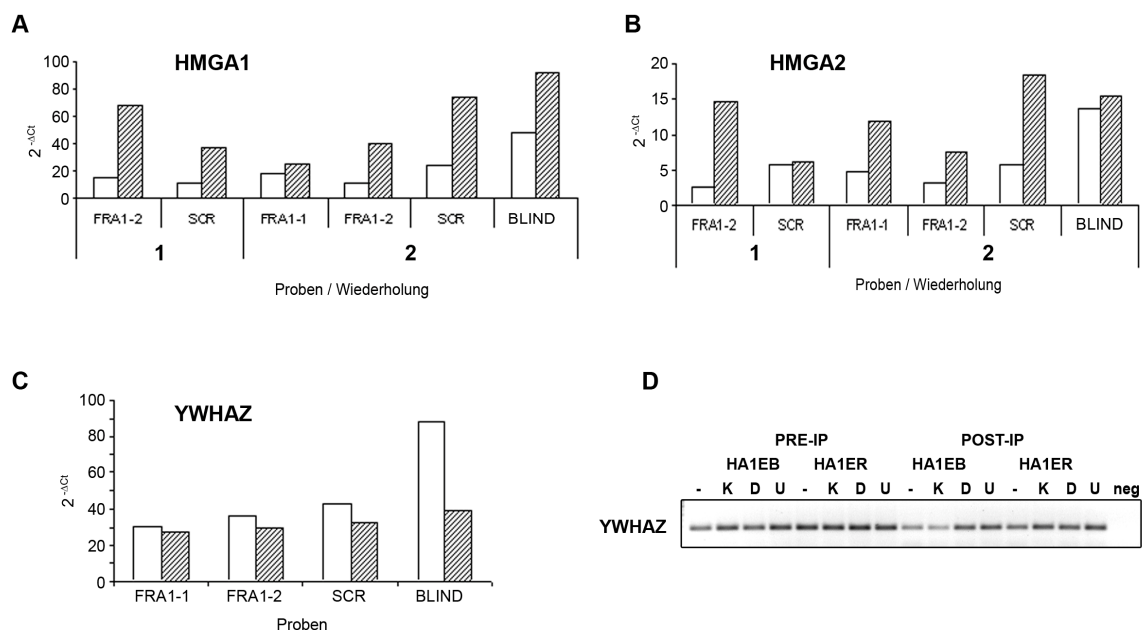


Abb. 4.31: Expressionsänderung von HMGA1, HMGA2 und YWHAZ nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung, sowie FRA1-ChIP-Anreicherung am YWHAZ-Promoter

Regulationsnachweis mit qPCR (10 ng) und ChIP **A** qPCR HMGA1, **B** qPCR HMGA2, **C** qPCR YWHAZ, **D** ChIP YWHAZ. K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126 □ HA1EB ▨ HA1ER, 1-2 Wiederholungen der Experimente

Regulation anderer Transkriptionsfaktoren

Über TRAP sind eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren (AREB6, E2F1, SP1, FOXO3A) identifiziert worden, die möglicherweise an der FRA1-vermittelten Expressionsregulierung beteiligt sind. Die Gene sind auf dem Microarray, wie in **Tab. 4.22** dargestellt, ohne signifikanten P-Wert und zeigen keine Regulierung nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung. Die Ergebnisse der Experimente sind in **Abb. 4.32** und **Abb. 4.33** aufgeführt.

Tab. 4.22: Expressionsänderung weiterer Transkriptionsfaktoren nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung in HA1EB und HA1ER

SYMBOL	ID	MEK-Inhibition			P-Wert			FRA1-Hemmung			
		P-Wert	Ratio		P-Wert			Ratio			
		Kontrolle	Kontrolle	U0126	HA1EB	HA1ER	BLIND	HA1EB FRA1-1	HA1EB FRA1-2	HA1ER FRA1-1	HA1ER FRA1-2
AREB6	208078_s_at	1,93E-15	1,17	0,88	0,11	0,50	1,55	3,09	4,42	1,65	1,32
	210875_s_at	7,23E-16	2,66	0,69	0,97	0,61	5,35	0,85	1,19	0,37	1,70
	212758_s_at	3,59E-19	1,38	0,75	0,46	0,46	2,03	1,03	1,44	0,49	1,07
	212764_at	2,48E-15	3,15	0,64	0,63	0,49	2,55	0,76	1,79	0,23	1,57
E2F1	204947_at	7,28E-15	0,97	1,10	0,03	0,57	1,40	1,27	1,50	0,94	0,93
	2028_s_at	7,28E-15	0,97	1,12	0,66	0,97	1,13	1,09	1,21	1,11	0,87
FOXO3A	204132_s_at	7,28E-15	1,04	1,44	0,19	0,55	1,22	0,59	0,57	0,56	0,64
	204131_s_at	7,28E-15	0,81	1,80	0,00	0,16	0,90	0,53	0,52	0,56	0,56
	210655_s_at	4,57E-15	1,04	1,26	0,10	0,23	1,04	0,52	0,41	0,61	0,69
SP1	212861_at	4,57E-15	1,08	0,93	0,16	0,30	0,59	2,26	1,64	1,57	1,53
	214732_at	4,57E-15	0,94	0,93	0,02	0,33	1,09	1,26	1,32	0,98	1,44

Dargestellt ist die Expressionsänderung von TRAP- und GSEA-identifizierten Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise mit der FRA1-vermittelten Transkription interagieren. Kontrolle: HA1ER-K vs. HA1EB-K, HA1EB/R: HA1EB/R-FRA1 vs. SCR, BLIND: HA1ER-BLIND vs. HA1EB-BLIND HA1EB/R-FRA1-1/2:HA1EB/R-FRA1-1/2 vs. SCR.

Zum Teil werden Transkriptionsfaktoren, die über TRAP und GSEA als mögliche Partner in der FRA1-abhängigen Regulation identifiziert wurden, ebenfalls durch FRA1 reguliert. Dies betrifft z.B. die Faktoren SP1 und FOXO3A (**Abb. 4.32 A** und **C**), die beide eine leichte Expressionsverminderung nach der siRNA-vermittelten FRA1-Hemmung zeigen. Die dazugehörigen ChIP-Experimente konnten nicht eindeutig ausgewertet werden. Für SP1 konnten zum Teil keine spezifischen PCRs etabliert werden (SP1-1 und SP1-4, **Abb. 4.32 B**). Für zwei der AP1-Bindestellen (SP1-2 und SP1-3) ist die PCR spezifisch, allerdings konnte nur bei SP1-3 eine Anreicherung fest-

gestellt werden. Die ChIP-PCR für FOXO3A zeigt kein Signal für die PreIP-Proben, daher fehlt der Vergleich zur PostIP. In dieser ist lediglich eine Anreicherung zwischen den Antikörpernegativproben und den Proben mit Antikörpern in HA1EB zu beobachten, in HA1ER ist der Effekt nicht vorhanden.

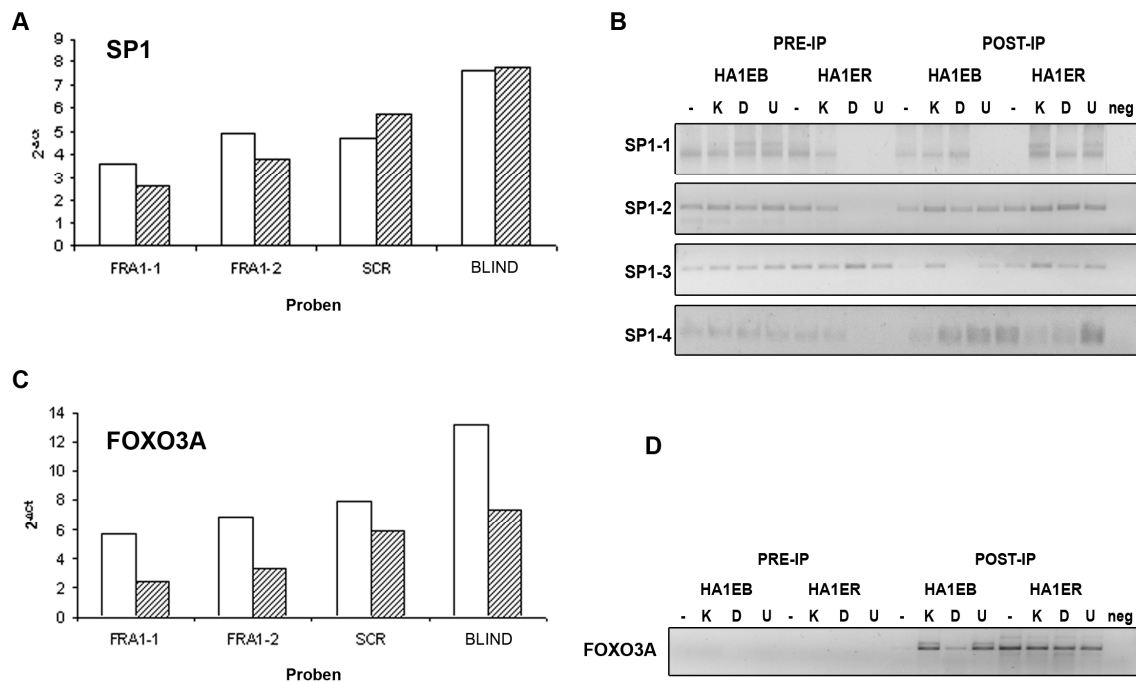


Abb. 4.32: Expressionsänderung von SP1 und FOXO3A nach FRA1-Hemmung, sowie FRA1-ChIP-Anreicherung am SP1 und FOXO3A-Promoter

Validierungen der Regulation mittels qPCR (10 ng) und ChIP **A** qPCR SP1, **B** ChIP SP1 (AP1 Bindestellen SP1-1 bis SP1-3), **C** qPCR FOXO3A, **D** ChIP FOXO3A. K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126. □ HA1EB ▨ HA1ER

AREB6 und E2F1, die ebenfalls als mögliche weitere Regulatoren der FRA1-abhängigen Transkription in Betracht kommen, sind nicht einheitlich durch die siRNA-vermittelte FRA1-Hemmung reguliert. Interessanterweise zeigt AREB6 im Einzelnachweis eine Expressionsverminderung nach FRA1-Hemmung. Dies widerspricht allerdings der Regulation wie sie die IDs für AREB6 auf dem Microarray zeigen. Hier ist aufgrund der unterschiedlichen Regulierung in den einzelnen IDs keine einheitliche Expressionsbeeinflussung durch die FRA1-Hemmung erkennbar. E2F1 wird nur in geringem Maße reguliert gefunden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei AREB6 und E2F1 um Zielgene der FRA1-vermittelten Transkription handelt.

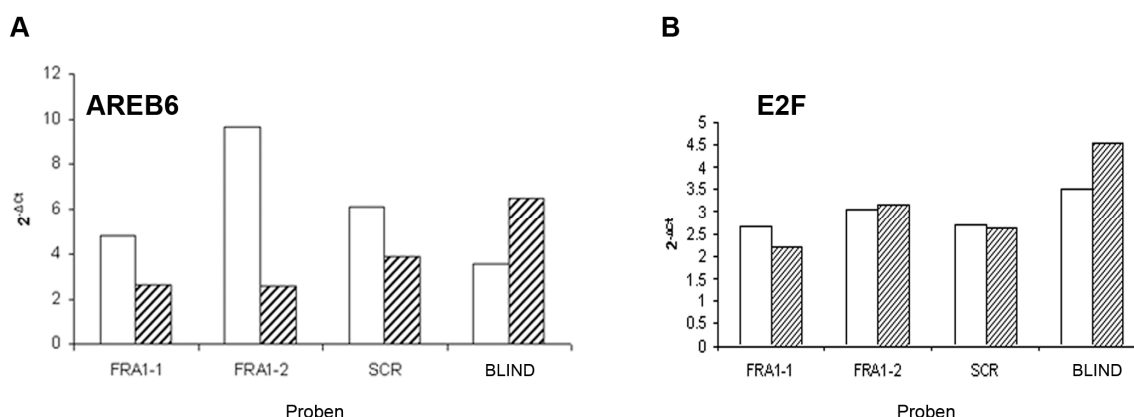


Abb. 4.33: Expressionsänderung von AREB6 und E2F1 nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung

Validierungen der Regulation mittels qPCR (20 ng), **A** AREB6, **B** E2F1 □ HA1EB ▨ HA1ER

Analyse weiterer potentieller FRA1-Zielgene

In den verschiedenen bioinformatischen Analysen sind neben Transkriptionsfaktoren auch andere Gene als potentielle direkte oder indirekte Zielgene von FRA1 identifiziert worden (Tab. 4.23 und Tab. 4.24). Diese gehören zum Teil zu immunoresponsiven Genen (OAS1, OAS2, OASL, SP110) (Abb. 4.34), zur extrazellulären Matrix (COL6A, ECM1, ECM2) (Abb. 4.35) oder zu Signaltransduktionsprozessen (RASSF1, WEE1, CXCL6, EFNA1, CDC42) (Abb. 4.36).

Tab. 4.23: Regulierung weiterer FRA1-Zielgene

SYMBOL	ID	MEK-Inhibition			FRA1-Hemmung						
		P-Wert	Ratio		P-Wert	Ratio					
		Kontrolle	Kontrolle	U0126	HA1EB	HA1ER	BLIND	HA1EB FRA1-1	HA1EB FRA1-2	HA1ER FRA1-1	HA1ER FRA1-2
CDC42	207273_at	3,59E-19	1,05	0,98	0,78	0,97	0,75	1,08	1,04	0,95	1,05
	208727_s_at	4,57E-15	1,00	1,06	0,91	0,04	0,82	0,96	1,15	1,50	2,41
	208728_s_at	1,63E-14	1,22	1,13	0,32	0,06	0,46	1,32	1,25	1,25	1,86
	210232_at	3,59E-19	0,88	1,05	0,57	0,99	0,89	1,09	1,14	1,19	0,84
	214230_at	1,93E-15	1,04	1,16	0,28	0,89	0,86	1,24	1,34	1,03	0,96
COL6A1	216904_at	1,93E-15	1,00	1,10	0,67	0,17	0,84	1,13	1,02	1,34	1,06
	213428_s_at	7,28E-15	0,65	1,13	0,06	0,02	2,72	0,70	0,50	0,39	0,61
	212938_at	4,57E-15	0,97	0,93	0,00	0,06	3,27	0,52	0,44	0,45	0,66

Dargestellt ist die Expressionsänderung von TRAP- und GSEA-identifizierten weiteren potentiellen FRA1-Zielgenen, die möglicherweise mit der FRA1-vermittelten Transkription interagieren. Kontrolle: HA1ER-K vs. HA1EB-K, HA1EB/R: HA1EB/R-FRA1 vs. SCR, BLIND: HA1ER-BLIND vs. HA1EB-BLIND HA1EB/R-FRA1-1/2: HA1EB/R-FRA1-1/2 vs. SCR

Tab. 4.24: Fortsetzung Regulierung verschiedener weiterer FRA1-Zielgene

SYMBOL	ID	MEK-Inhibition			FRA1-Hemmung						
		P-Wert	Ratio		P-Wert		Ratio				
		Kontrolle	Kontrolle	U0126	HA1EB	HA1ER	BLIND	HA1EB FRA1-1	HA1EB FRA1-2	HA1ER FRA1-1	HA1ER FRA1-2
COL6A1	212940_at	4,57E-15	0,71	0,99	0,17	0,08	3,02	0,68	0,42	0,35	0,61
	212939_at	2,48E-15	0,97	1,28	0,98	0,58	1,20	0,99	0,99	1,05	1,02
	212937_s_at	1,63E-14	0,90	0,89	0,08	0,06	2,89	0,50	0,49	0,52	0,68
	214200_s_at	3,59E-19	0,94	0,99	0,30	0,75	0,92	1,11	1,26	0,95	1,14
	212091_s_at	4,57E-15	0,84	0,97	0,07	0,07	2,00	0,58	0,54	0,39	0,60
CXCL6	206336_at	1,93E-15	0,90	0,71	0,02	0,65	0,21	0,11	0,01	0,80	3,19
ECM1	209365_s_at	1,63E-14	0,64	1,21	0,06	0,04	0,62	0,65	0,28	0,54	0,47
ECM2	206101_at	7,23E-16	0,87	1,06	0,23	0,65	0,79	1,42	1,02	1,20	0,92
EFNA1	202023_at	7,28E-15	0,53	1,25	0,02	0,12	0,87	0,49	0,20	1,93	1,38
OAS1	202869_at	4,57E-15	0,07	0,82	0,08	0,71	0,01	11,80	4,37	0,65	0,48
	205552_s_at	4,57E-15	0,06	1,03	0,05	0,87	0,00	11,59	4,61	1,31	0,57
OAS2	204972_at	4,57E-15	0,09	1,07	0,04	0,35	0,03	10,37	3,97	0,74	0,51
	206553_at	1,63E-14	0,46	0,99	0,11	0,87	0,11	7,73	2,23	1,11	0,83
OASL	205660_at	1,93E-15	0,14	0,86	0,03	0,77	0,02	9,11	3,61	0,64	0,58
	210797_s_at	4,57E-15	0,12	0,83	0,08	0,88	0,03	7,59	3,64	0,73	0,58
RASSF1	204346_s_at	1,93E-15	0,96	1,39	0,05	0,45	0,53	1,22	1,30	1,24	1,15
SP110	208012_x_at	1,93E-15	0,46	0,88	0,01	0,99	0,14	3,65	4,14	1,10	0,91
	208392_x_at	4,57E-15	0,57	0,99	0,12	0,29	0,29	1,72	1,37	0,80	1,00
	209761_s_at	2,48E-15	0,41	0,80	0,08	0,88	0,10	3,77	3,77	1,08	0,96
	209762_x_at	3,59E-19	0,40	0,88	0,01	0,85	0,12	4,91	6,27	0,91	1,01
WEE1	215711_s_at	4,57E-15	1,40	0,88	0,14	0,05	0,96	1,15	1,98	1,95	2,01
	212533_at	7,28E-15	1,14	1,09	0,04	0,01	1,06	1,62	2,07	3,18	2,86

Dargestellt ist die Expressionsänderung von TRAP- und GSEA-identifizierten weiteren potentiellen FRA1-Zielgenen, die möglicherweise mit der FRA1-vermittelten Transkription interagieren. Kontrolle: HA1ER-K vs. HA1EB-K, HA1EB/R: HA1EB/R-FRA1 vs. SCR, BLIND: HA1ER-BLIND vs. HA1EB-BLIND HA1EB/R-FRA1-1/2: HA1EB/R-FRA1-1/2 vs. SCR

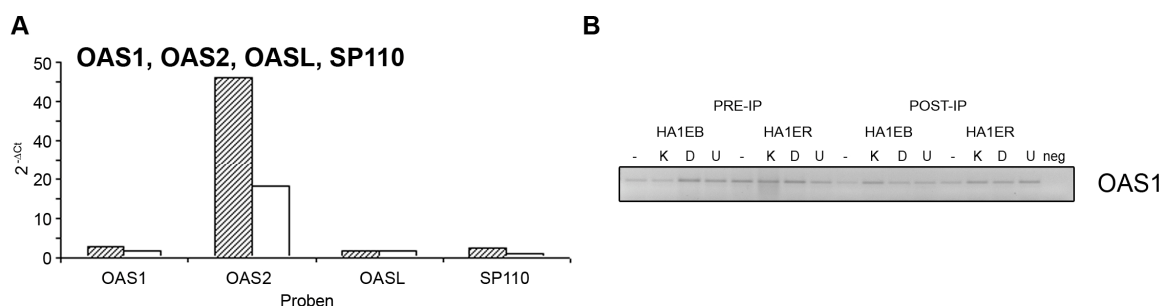


Abb. 4.34: Expressionsänderung von OAS1, OAS2, OASL und SP110 nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung und FRA1-ChIP-Anreicherung am OAS1-Promoter

A Validierungen der Regulation von OAS1, OAS2, OASL, SP110 mittels qPCR (50 ng) in HA1ER.

□ siRNA FRA1-2B ▨ Scrambled siRNA. **B** FRA1-ChIP Anreicherung am OAS1-Promoter K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126

Die vier Gene OAS1, OAS2, OASL und SP110 sind durch die TRAP Analyse als potentielle Zielgene von FRA1 identifiziert worden. Die Regulation nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung ist für die Gene nicht eindeutig, da es nach Behandlung mit dem FRA1-1-Oligo zur Aufregulierung kommt, nach Behandlung mit FRA1-2 jedoch zur Abregulierung der Genexpression (**Tab. 4.24**). Die Validierungsexperimente zeigen für OAS1, OAS2 und SP110 nach Behandlung der Zellen mit FRA1-2 in der qPCR keine deutliche Regulierung (**Abb. 4.34**) in HA1ER. Eine ChIP-PCR, die parallel für OAS1 durchgeführt wurde, zeigte eine leichte Anreicherung gegenüber der Negativkontrolle. Da die Ergebnisse nicht eindeutig sind, konnte keines der Gene als FRA1-Zielgen validiert werden, obwohl für OAS1, OAS2, OASL und AP1-Bindestellen identifiziert worden sind (Szymon Kielbasa, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik).

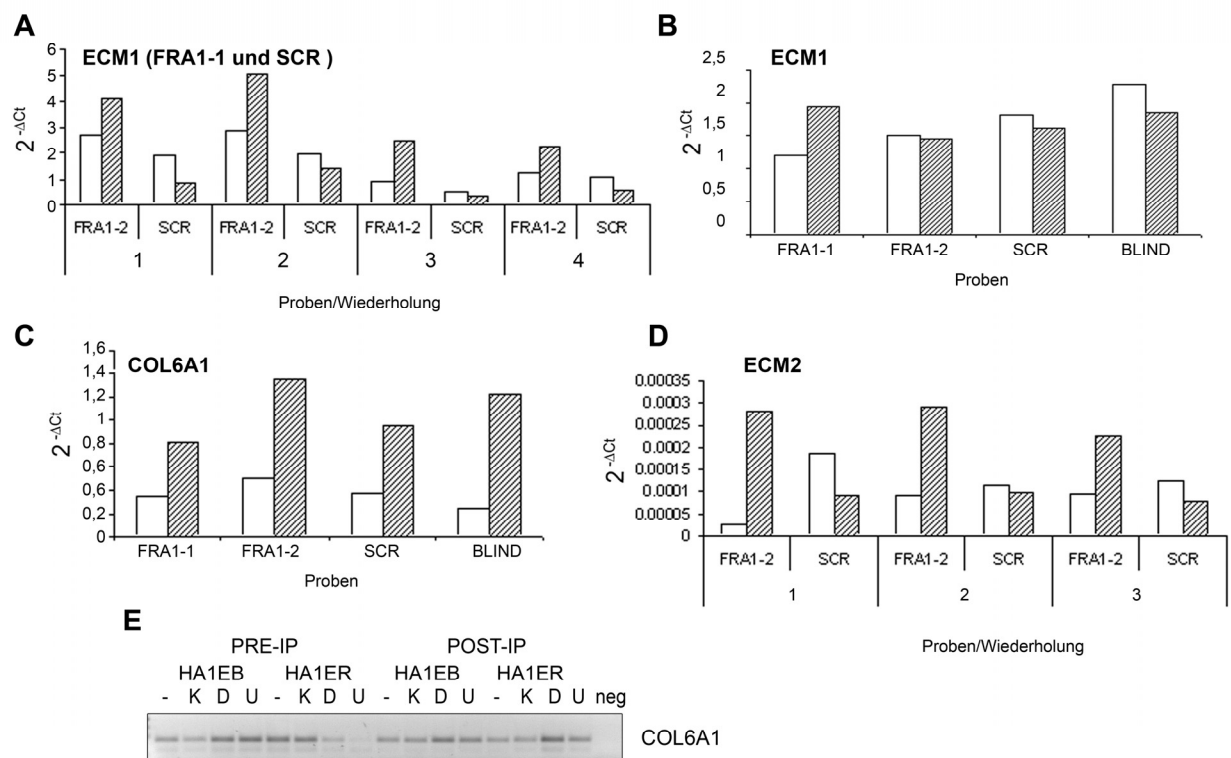


Abb. 4.35: Expressionsänderung von COL6A1, ECM1 und ECM2 nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung und FRA1-ChIP-Anreicherung am COL6A1-Promoter

Validierungen der Regulation mittels qPCR (10 ng) und ChIP **A,B** qPCR ECM1 (1-4 Wiederholungen), **C** qPCR COL6A1, **D** qPCR ECM2, **E** FRA1-ChIP am COL6A1 Promoter. □ HA1EB ▨ HA1ER. K-Kontrolle, D-DMSO, U-U0126

COL6A1, ECM1 und ECM2 wurden über TRAP als mögliche Zielgene der FRA1-vermittelten Transkription ermittelt. Allerdings konnte die Regulation der Expression nach FRA1-Hemmung aus dem Microarray in der Einzelanalyse für keines der Gene validiert werden (Abb. 4.35, Tab. 4.23 und Tab. 4.24). Die für COL6A1 durchgeführte FRA1-ChIP-Analyse erzielte ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis. Hier konnte zwar eine Anreicherung zwischen Proben ohne Antikörper und mit Antikörper bei DMSO/U0126-behandelten Proben in HA1ER gemessen werden, aber nicht bei unbehandelten HA1ER-Zellen oder in HA1EB. Daher können COL6A1, ECM1 und ECM2 nicht als FRA1-abhängige Zielgene der RAS-ERK-vermittelten Transkription bestätigt werden.

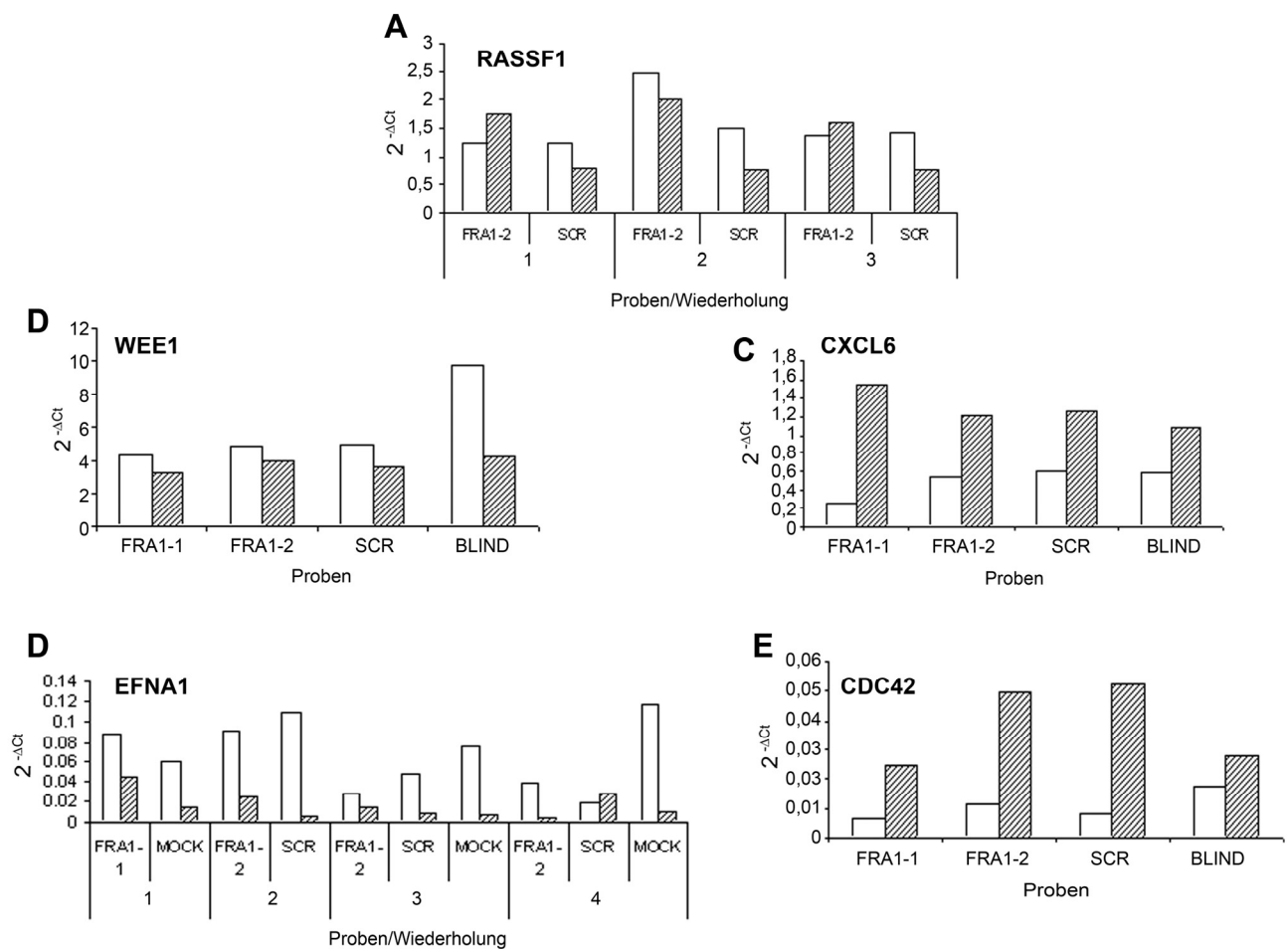


Abb. 4.36: Expressionsänderung von RASSF1, WEE1, CXCL6, EFNA1 und CDC42 nach siRNA-vermittelter FRA1-Hemmung

Validierung der Expressionsänderung nach FRA1-siRNA-Behandlung mittels qPCR (10 ng), **A** RASSF1, **B** WEE1, **C** CXCL6, **D** EFNA1, **E** CDC42. □ HA1EB ▨ HA1ER

RASSF1, WEE1, CXCL6, EFNA1, CDC42 (**Abb. 4.36**) sind ebenfalls als Zielgene der FRA1-vermittelten Transkription identifiziert worden. Von diesen Genen ist zum Teil bekannt, dass sie eine Rolle in der RAS-vermittelten Veränderung des Transkriptoms spielen und für die Ausbildung des malignen Phänotyps essentiell sind (CDC42, Qiu et al. 1997). Wie in **Tab. 4.23** und **Tab. 4.24** zu sehen, werden sie sehr unterschiedlich reguliert, zum Teil sind sie in HA1ER gering exprimiert und werden über die FRA1-Hemmung in HA1EB wieder stärker exprimiert (RASSF1, CXCL6, EFNA1) oder in HA1EB herunterreguliert (CXCL6, EFNA1). CDC42 und WEE1 sollten keinen signifikanten Unterschied zwischen HA1EB und HA1ER zeigen, jedoch sollte eine Aufregulierung der Expression nach FRA1-Hemmung zu beobachten sein. Für die meisten der dargestellten Gene konnte die Regulation nicht vollständig validiert werden (**Abb. 4.36**), da die Validierungsexperimente widersprüchliche (EFNA1, **Abb. 4.36D**) oder dem Microarray entgegengesetzte Regulierungen (WEE1, CDC42, CXCL6, **Abb. 4.36B, C** und **E**) zeigten. Allein RASSF1 zeigt eine dem Microarray entsprechende Regulierung und kann daher als Zielgen der RAS-FRA1-vermittelten Transkription angesehen werden.

5. Diskussion

5.1 Analyse RAS-MEK-abhängiger transkriptioneller Netzwerke

5.1.1 Aktive Signalwege in HA1EB und HA1ER und phänotypische Effekte

RAS ist in der Lage verschiedene Signalwege zu regulieren, die sich in abhängig vom Zelltyp und Organismus in ihrer Aktivierung unterscheiden (Katz et al. 1997, Hana-han et al. 2000). Dies trifft auch auf das hier betrachtete Zellpaar immortaler HA1EB und HRAS-transformierter HA1ER zu. Aus Vorarbeiten (Krapfenbauer, unveröffentliche Daten), ist bekannt, dass in HA1ER im Vergleich zu HA1EB die RAF/MEK/ERK- und RAL-GDS/RAL-Signalwege stark aktiviert sind, während der PI3K/AKT-Signalweg kaum einen Aktivierungsunterschied zwischen beiden Zelllinien zeigt. Sowohl der MAPK (MEK-ERK) als auch der RAL-GDS-Signalweg haben einen starken Einfluss auf den transformierten Phänotyp durch eine Erhöhung der Proliferation (MEK/ERK) und die Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie der Zellumgebung bzw. der extrazellulären Matrix (RAL) (Katz et al. 1997). Da die transformierten HA1ER-Zellen im Gegensatz zu HA1EB auch im Softagar wachsen können (**Abb. 4.22**), ist eine Veränderung des Proliferationsverhaltens sowie des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix nachvollziehbar, denn dies ist wichtig für das Aufrechterhalten des ankerunabhängigen Wachstums (Weinberg 2006). Ein morphologischer Effekt ist ebenfalls detektierbar. Die HA1ER-Zellen weisen in frühen kontinuierlichen Passagen deutlich aufgeworfene Zellränder und eine raumgreifendere, gestrecktere Zellstruktur auf.

5.1.2 RAS-gesteuerte Netzwerke sind in hohem Maße interaktiv

Aus der Literatur ist bekannt, dass die von RAS angesteuerten Signalwege miteinander interagieren (Sahai et al. 2002, Mitin et al. 2006). Auch von MAPK-Signalwegen ist eine Crossregulierung bekannt (Wolfmann et al. 2002, Paumelle et al. 2000, Poux-Blenis et al. 2004). Bereits in den Expressionsprofilen der MEK-ERK-Signalwegs-

hemmung (4.2.1) sind regulatorische Überlappungen mit anderen Signalkaskaden festgestellt worden. Beispielsweise wird der signifikant RAS-ERK-abhängig abregulierte Transkriptionsfaktor ATF3 (**Tab. 4.2**) in der Literatur als RAL-GDS-JNK/JUN:-ATF2-Zielgen beschrieben (Liang et al. 1990, Cai et al. 2000). Eine Regulation über MEK/ERK ist bisher nur mittelbar über die Regulierung des Transkriptionsfaktors EGR1 gezeigt worden (Yamaguchi et al. 2006, Osawa et al. 2004). ATF3 kann, wie auch der RAS-abhängig aufregulierte Faktor FRA1 mit JUN ein Dimer bilden. Da ATF3 und FRA1 RAS-abhängig gegensätzlich reguliert und über verschiedene Signalwege angesteuert werden, ist hier die Regulierung unterschiedlicher Signalwege von besonderem Interesse. Zwischen den einzelnen Komponenten des AP1-Komplexes existiert ein Gleichgewicht, das sich je nach Stimulus ändert und durch das Zusammenspiel verschiedener MAPK-Signalwege reguliert wird (Reddy et al. 2002, Talotta et al. 2009). Hamdi et al. 2008 haben publiziert, dass ATF3 und FRA1 in Glioblastomzellen stressabhängig gegensätzlich reguliert werden und unterschiedliche Funktionen in der Stressantwort haben. So wird ATF3 als antiapoptotisches JNK-abhängiges Gen und FRA1 als proapoptotisches ERK-abhängiges Gen beschrieben. ATF3 wird ERK-abhängig herunterreguliert, währenddessen FRA1 aufreguliert wird und umgekehrt. Dies spiegelt die Regulation im Vergleich HA1EB und HA1ER sowie nach Hemmung der MEK-ERK-Kaskade wider (**Tab. 4.2**). Interessanterweise sind einige ATF3/AP1 spezifischen Zielgene (TPBG, TNFSF10, PLOD2, DUSP2, BIRC2, RIPK2, MX2, Gilchrist et al. 2006) auch RAS-abhängig reguliert (Anhang, **Tab. XV**). JUN, der Bindepartner von ATF3 und FRA1 im AP1-Komplex, wird ebenfalls durch die verschiedenen Signalkaskaden (ERK, JNK) unterschiedlich reguliert (Reddy et al. 2002). Eine RAS-ERK-abhängige Regulation konnte in der vorliegenden Arbeit aber nicht festgestellt werden (**Tab. 4.3**). Auch bei weiteren regulierten Genen ist eine Wechselwirkung mit anderen Signalwegen möglich. So kann der TCF („ternary complex factor“) ELK3 sowohl durch ERK, als auch durch JNK phosphoryliert werden (Ducret et al. 2000). Die TCFs konkurrieren mit den Transkriptionsfaktoren der MRTF-Familie („myocardin related transcription factors“) um eine Bindung an SRF (Posern et al. 2006). Während die TCFs hauptsächlich durch MAPK gesteuert werden und in Zellfunktionen wie Proliferation und Zellzyk-

lus eingebunden sind (Buchwalter et al. 2004), steuern die MRTFs in Kombination mit SRF Gene des Zytoskeletts und werden über RHO-GTPasen wie RHOA und CDC42 gesteuert. Im Vergleich HA1EB und HA1ER werden RAS-abhängig der TCF ELK3 und der MRTF MAL reguliert, so dass SRF mit beiden Komplexe eingehen könnte. Es ist anzunehmen, dass auch beide Interaktionen eine Bedeutung im Zuge der onkogenen Transformation in HA1ER haben, da hier sowohl ein verändertes Proliferationsverhalten, als auch eine veränderte Zellmorphologie zu beobachten ist. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der auch durch andere Signalkaskaden als MEK-ERK gesteuert werden kann, ist STAT1. Dieser kann zusätzlich über den JAK-STAT-Signalweg reguliert werden (Bhinge et al. 2007) sowie über die p38-MAPK (Yang et al. 2003). Durch die hier an Beispielen dargestellten Verbindungen zwischen den Signalkaskaden ist ersichtlich, dass eine klare Zuordnung der Zielgene zu bestimmten Regulatoren schwierig ist.

5.1.3 SRF/ELK3 und FRA1 bilden kein direktes hierarchisches Netzwerk

In der vorliegenden Arbeit ist die These aufgestellt worden, dass es in den RAS-transformierten HA1ER-Zellen gegebenenfalls zu einer MEK-ERK-abhängigen hierarchischen Aktivierung des transkriptionellen Netzwerks kommt (Kapitel 2). In der ersten Phase wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren RAS-ERK-abhängig in HA1ER aufreguliert gefunden. Dazu gehörten ELK3 und FRA1. Zur Transkription von FRA1 ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie SRF und ELK1 notwendig. Über die Aktivierung von kurzlebigen cFOS-JUN/AP1-Komplexen wird FRA1 exprimiert, welches cFOS aus dem AP1-Komplex verdrängt (Reddy et al. 2002, Talotta et al. 2009) (**Abb. 5.1.**). Für cFOS ist bekannt, dass es durch ELK1, aber auch (negativ) durch ELK3 reguliert werden kann (Murphy et al. 2006, Giovane et al. 1997, Riggelen et al. 2005, Gross et al. 2007). So könnte ELK3 ebenfalls an der RAS-abhängigen Regulierung von FRA1 beteiligt sein.

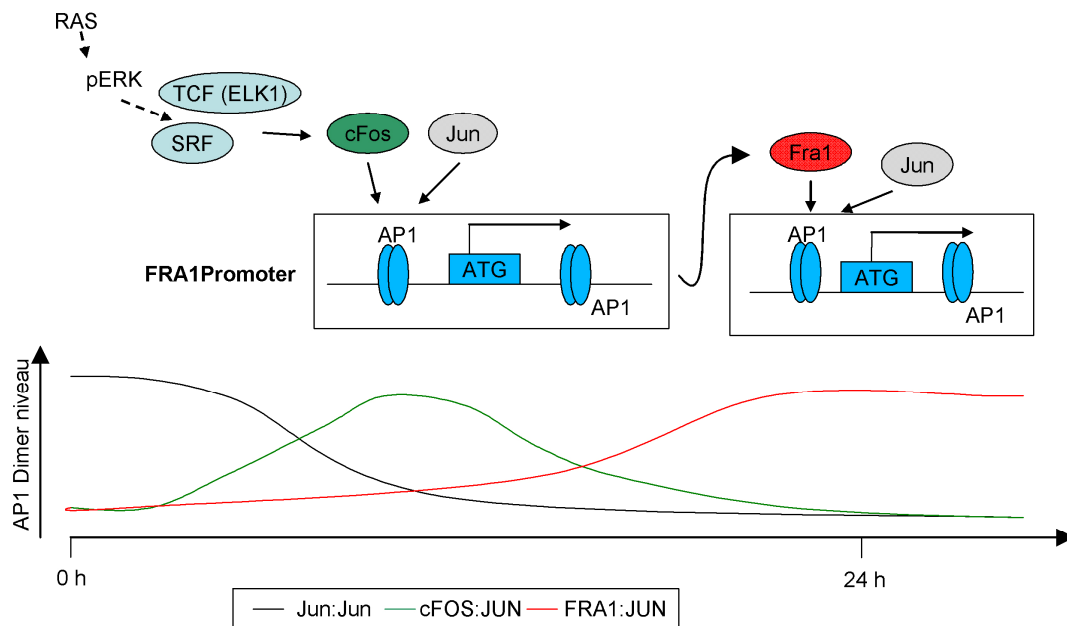


Abb. 5.1: Schema der hierarchischen FRA1-Transkriptionsregulation (nach Talotta et al. 2009)

In unstimulierten Zellen liegen zum größten Teil Jun:Jun-Dimere (schwarz) vor, die nach Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade von kurzlebigen cFOS:JUN-Dimeren (grün) verdrängt werden. Nach initialer Transkription von FRA1 verschiebt sich das Gleichgewicht bei konstanter Aktivierung der Signalkaskade innerhalb von 24 h zu FRA1: JUN-Dimeren (rot), wobei cFOS aus dem Dimer verdrängt wird. FRA1:JUN vermittelt eine autoregulatorische Aktivierung von FRA1.

In den hier durchgeführten Analysen konnte diese These nicht zufriedenstellend bestätigt werden. Geht man von einer RAS-ERK-abhängigen Regulierung und einer zweistufigen cFOS-abhängigen Regulation (**Abb. 5.1**) aus, müsste für die FRA1-Expression die Expression von SRF und ELK3 essentiell sein, zumal die Expression von ELK3 RAS-MEK/ERK-abhängig ist (**Tab. 4.2**). Daher sollte FRA1 auch in den Microarraydaten der siRNA-Experimente von SRF und ELK3 reguliert gefunden werden. Wenn es sich um eine SRF- und ELK3-abhängige Regulation von FRA1 handelt, sollten zudem gemeinsam regulierte Gene der drei Transkriptionsfaktoren identifizierbar sein. In **Abb. 4.23** ist zu sehen, dass es sowohl in HA1EB, als auch in HA1ER Überschneidungen in den Zielgenen aller drei Transkriptionsfaktoren gibt. Allerdings sind in den jeweiligen Schnittmengen in HA1EB und HA1ER keine der in **Tab. 1.2** enthaltenen bekannten Zielgene von FRA1 vorhanden, daher können ohne zusätzliche Analysen auf AP1 Bindestellen keine sicheren Schlüsse aus den Schnittmengen gezogen werden. Auch die Analyse der SRF, FRA1 und ELK3-spezifisch regulierten Gene in HA1EB und HA1ER ergab keine

eindeutigen Hinweise auf eine gegenseitige Regulation der Transkriptionsfaktoren. SRF, ELK3 und FRA1 werden demnach nicht durch die Hemmung der jeweils anderen Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Lediglich nach der Hemmung von SRF in HA1EB ist FRA1 als stark aufreguliertes Gen identifizierbar (Anhang, **Tab. IV**). Bisher ist FRA1 allerdings als positives Zielgen der MAPK-SRF/TCF-vermittelten Transkription bekannt (Reddy et al. 2002). Der MEK-ERK Signalweg ist in den immortalen HA1EB nicht konstitutiv aktiv. Daher sind sowohl SRF als auch ELK3 möglicherweise nicht phosphoryliert. Wie in **Abb. 4.9 A** zu sehen, konnte kein Unterschied von phosphoryliertem SRF zwischen HA1EB und HA1ER festgestellt werden. Phospho-ELK3 ist nicht überprüft worden, da zum Zeitpunkt der Experimente kein phosphospezifischer Antikörper zur Verfügung stand. Im unphosphorylierten Zustand ist ELK3 ein transkriptioneller Repressor (Ducret et al. 2000), der nach Riggelen et al. 2005 die Transkription von cFOS hemmen kann. Eine ChIP-Analyse der Phosphorylierung und Bindung von ELK3 an den cFOS-Promoter könnte Aufschluss darüber geben, ob ELK3 für die Hemmung von cFOS und nachfolgend von FRA1 verantwortlich sein kann.

Aus verschiedenen Publikationen ist bekannt, dass die transkriptionelle Aktivierung von FRA1 über cFOS/AP1 bereits nach 24 h abklingt und durch eine Autoregulation über FRA1/AP1 ersetzt wird (Reddy et al. 2002, Talotta et al. 2009), wobei FRA1 dann über eine Phosphorylierung durch ERK stabilisiert wird (Basbous et al. 2007). Die Aktivierung von cFOS über TCFs und die nachfolgende transkriptionelle Erstaktivierung von FRA1 müsste also innerhalb der ersten 24 h vonstatten gehen. Diesen Prozess kann man in den HRAS-transformierten HA1ER aufgrund der konstitutiven Aktivierung der MEK-ERK-Signalkaskade nicht mehr beobachten. Trotzdem ist es möglich, über die Phosphorylierung möglicher übergeordneter Transkriptionsfaktoren Rückschlüsse auf ihre Rolle bei der Aktivierung von FRA1 zu ziehen. Der ERK-abhängige Faktor ELK1 ist als essentiell für die Aktivierung von cFOS (und nachfolgend FRA1) publiziert worden (Price et al. 1995). Eine Änderung der Phosphorylierung konnte allerdings weder RAS- noch ERK-abhängig nachgewiesen werden (**Abb. 4.9**). Daher ist unklar, welcher TCF in den vorliegenden Zellen an der transkriptionellen Aktivierung von cFOS und nachfolgend FRA1 beteiligt ist.

5.1.4 ELK3, SRF und FRA1 sind Teile eines gemeinsamen Netzwerks

Die Microarrayanalysen, wie sie im Kapitel 4.4.2 dargelegt sind, zeigen deutlich, dass sowohl in den immortalen HA1EB als auch in den HRAS-transformierten HA1ER-Zellen gemeinsam regulierte Gene der drei Transkriptionsfaktoren SRF, FRA1 und ELK3 existieren. Allerdings sind diese gemeinsam regulierten Gene von SRF, ELK3 und FRA1 HA1EB- bzw. HA1ER-spezifisch, es existieren keine Überlappungen.

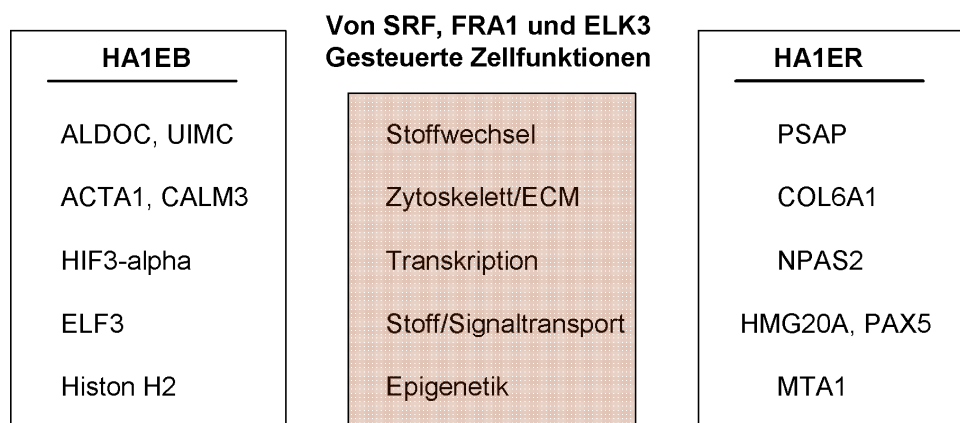


Abb. 5.2: Beispiele gemeinsamer Zielgene von SRF, ELK3 und FRA1 in HA1EB und HA1ER sowie Funktionen der Zielgene.

Interessanterweise sind die gemeinsamen Zielgene von SRF, FRA1 und ELK3 sowohl in HA1EB als auch in HA1ER an ähnlichen Prozessen der Zelle beteiligt (**Abb. 5.2**). In beiden Zelllinien finden sich SRF/ELK3/FRA1-abhängig gesteuerte Gene die in den zellulären Stoffwechsel eingreifen (ALDOC, UIMC1, PSAP), am Aufbau des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix beteiligt sind (ACTA1, CALM3, COL6A1), Transkriptionsfaktoren, die in unterschiedliche Funktionsbereiche eingebettet sind (HIF3alpha, NPAS2, HMG20A, PAX5, ELF3) sowie Gene des Stofftransports (TRIM23, OR7C1) (Wang et al. 2007, Wu et al. 2009, Gunia et al. 2009, Visegrady et al. 2010, Berchtold et al. 1993, Alexopoulos et al. 2009, Maynard et al. 2007, Yi et al. 2009, Sumoy et al. 2000, Stuart et al. 1996, Thines et al. 2010, Poole et al. 2009, Durzynski et al. 2005).

Die Gruppe der angesteuerten Transkriptionsfaktoren wurde, wie in der Tabelle des Anhangs **Tab. X** dargestellt, genauer untersucht. Hier wurden große Unterschiede zwischen spezifisch in HA1EB und HA1ER angesteuerten Transkriptionsfaktoren festgestellt. Eine GO-Analyse zu den „Biologischen Prozessen“, an denen die Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, zeigte dass diese in HA1EB sowohl an Prozessen wie „Entwicklung“ als auch „posttranslationale Proteinmodifikation“ und „zellulärer Metabolismus“ beteiligt sind. In den HA1ER können die Transkriptionsfaktoren lediglich dem Bereich „zellulärer Metabolismus“ als funktionell angereicherte Gruppe zugeordnet werden. Für einzelne Transkriptionsfaktoren sind interessante Funktionen bekannt. In HA1ER werden PAX5 und NPAS2 sowie MTA1 von FRA1, SRF und ELK3 gemeinsam angesteuert. Diese Transkriptionsfaktoren sind an Differenzierungsprozessen, der Regulation der zirkadianen Uhr sowie Metastasierungsprozessen beteiligt (Bertolucci et al. 2008, Stuart et al. 1996, Toh et al. 1994, Hofer et al. 2004). Da auch die Deregulierung der Differenzierung und der zirkadianen Uhr an der onkogenen Transformation von Zellen beteiligt sind, können so Hinweise über mögliche molekulare Grundlagen gefunden werden.

PAX5, NPAS2 und MTA1 sind die einzigen gemeinsamen SRF/FRA1/ELK3-Zielgene in HA1ER, die eine unmittelbare Rolle bei der onkogenen Transformation spielen. Die alleinige Analyse der FRA1-spezifischen Zielgene (**Anhang Tab. XI, Tab. XII B, Tab. 4.16 und 4.17, Tab. 4.19-21**) zum Beispiel zeigte eine deutliche Deregulation der angesteuerten Zielgene und eine Regulierung tumorrelevanter Gene im Vergleich von HA1EB und HA1ER (AEBP1, STAT3, NPAS2, TCFL5 und andere). So ist die spezifische Verschiebung der individuellen Zielgene von SRF, ELK3 und FRA1 als Folge der RAS-Transformation in HA1ER, unabhängig von gemeinsam regulierten Genen, ein essentieller Faktor bei der onkogenen Transformation der Zelle. Die unabhängige essentielle Funktion der drei Transkriptionsfaktoren für das Überleben der Zelle und die Promotion ankerunabhängigen Wachstums ist auch in den verschiedenen Proliferationsassays nachvollziehbar. Bereits die siRNA-vermittelte Hemmung der einzelnen Transkriptionsfaktoren führt zu einer Wachstumsreduktion der Zellen in Zellkulturschalen (**Abb. 4.21**) sowie im Softagar (**Abb. 4.22**).

5.1.5 FRA1-Zielgene in HA1EB und HA1ER

Für FRA1 konnte durch eine Analyse der Zielgene in HA1EB und HA1ER (**Abb. 4.23**, Anhang **Tab. XVI**) eine RAS-abhängige Verschiebung der Zielgenpopulationen gezeigt werden. Zu den überlappenden Genen gehören metabolismusassoziierte Gene wie APOE, PRCP, PSMA1 (Bonomini et al. 2010, Palmiter et al. 2009, Bouchelouche et al. 2010) und Zellstruktur- und Zellinteraktionsfaktoren wie COL7A1 und MFAP1 (Pendaries et al. 2010, Andersen et al. 2008). Daneben können Gene für Transportproteine wie GABBR1, ITGA7 und RAMP1 (Li et al. 2009, Lee et al. 2007, Sabharwal et al. 2010) identifiziert werden sowie signaltransduktionsassoziierte Gene wie PAK4, RSK und WEE1 (Fisher et al. 2009, Hauge et al. 2006, Indovina et al. 2010). In der Schnittmenge sind außerdem einige Transkriptionsfaktoren (SPDEF, PAX8 und ELL1) identifizierbar. Diese sind an Differenzierungsprozessen beteiligt und auch zum Teil in die Steuerung des Metabolismus eingebunden (Moussa et al. 2009, Stuart et al. 1996, Sakurai et al. 2004).

Über die TRAP-Analyse konnten in HA1EB und HA1ER potentielle direkte Zielgene von FRA1/AP1 identifiziert werden. Dazu gehören in HA1EB Isoformen der Histone H1 und H2 (**Tab. 4.19**) sowie die immunresponsiven Gene IFIT1, ISG15, OAS1, OAS2 und OASL (Melchjörssen et al. 2009, Pincetic et al. 2010, Lund et al. 2006). In den RAS-transformierten HA1ER werden diese Gene nach der Hemmung von FRA1 nicht reguliert. Hier konnte aufgrund der geringen Anzahl regulierter Gene auch keine Überrepräsentation von Funktionen in den durch TRAP-Analyse identifizierten direkten FRA1/AP1-Zielgenen gefunden werden. Die Analyse der Expressionsdaten zeigt jedoch, dass vereinzelt signalwegassoziierte Gene (VEGFR, CDC42, MEK2, MEK5, YWHAZ) von der FRA1-Hemmung beeinflusst werden. Von diesen besitzen VEGFR und YWHAZ AP1-Bindestellen (siehe Kapitel 4.4.6). Daneben kann in der Expressionsanalyse eine Reihe von regulierten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (**Anhang Tab. XII B**), die in großen Teilen mit denen der GSEA-GO-Analyse übereinstimmen (**Abb. 4.24**). Zusätzlich sind Gene identifiziert worden (SMARCA4, PCGF2, PHF1 VEZF), die eine Funktion in epigenetischen Vorgängen innehaben (Cao et al. 2010, Gil et al. 2005, Baker et al. 2008, Aguilera et al. 2010).

Viele Gene, die von FRA1 in HA1ER reguliert werden, haben Funktionen in verschiedenen Signalwegen inne. So finden sich unter den Zielgenen von FRA1 RHO-GEFs wie DOCK6, DOCK9 und ARHGEF9 (Miyamoto et al. 2007, Kuramoto et al. 2009, Grosskreutz et al. 2001) sowie RHO-GTPasen wie GMIP, PAK2, PLXNB1, SAR1A, SNX26 (Tadokoro et al. 2005, Bright et al. 2009, Hota et al. 2009, Taneja et al. 2009, Chiang et al. 2003) und andere Regulatoren von RAC/RHO-Signalwegen wie ABR (Cho et al. 2007). RHO-Signalwege steuern unter anderem Gene der Zellstruktur, so dass eine Rolle von FRA1 bei der Veränderung der Morphologie und des Proliferationsverhaltens der HA1ER-Zellen möglich ist. Daneben gibt es Verbindungen zur Regulation von p38/JNK-AP1-Signalwegen über die Steuerung von GADD45B, MEN1 (Ju et al. 2009, Gallo et al. 2002), P53/PI3K über TSC2, PDPK1 (Tee et al. 2003, Ericson et al. 2010) und WNT über ECM1 (Kenny et al. 2005).

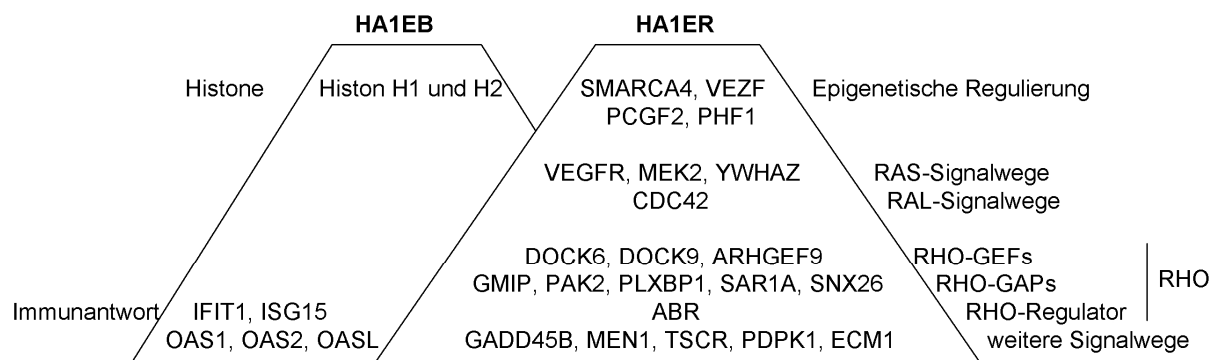


Abb. 5.3: spezifische funktionelle Gruppen von FRA1-Zielgenen im Vergleich HA1EB und HA1ER

Wie im Kapitel 4.4.6 dargestellt, wurden von den 38 untersuchten einzelnen Genen fünf als Zielgene von FRA1 validiert: AEBP1, FRA1, NPAS2, TCFL5 und YWHAZ. Bis auf NPAS2 wurde diese Validierung sowohl in der qPCR, als auch in der ChIP durchgeführt. Neben diesen sicheren Zielgenen können FOXL1, SLC2A4RG, RASSF1, FOXO3A und AREB6 ebenfalls mögliche Zielgene der RAS-ERK-FRA1-abhängigen Transkription sein. Allerdings ist bei diesen die Validierung nicht so eindeutig wie bei den oben genannten Genen. Zusätzlich existiert von keinem dieser Gene ein ChIP-Nachweis. Daher werden diese Gene nachfolgend auch nicht im Einzelnen diskutiert.

Neben AEBP1, FRA1, NPAS2, TCFL5 und YWHAZ wurden in der CHIP die bereits bekannten Zielgene der FRA1-vermittelten Transkription CCND1 und VEGFR als direkte Zielgene bestätigt (Mechta et al. 1997, Zippo et al. 2007).

5.1.6 Das Netzwerk direkter RAS- MEK/ERK-abhängiger FRA1 Zielgene

AEBP1

AEBP1 wurde 1999 als Carboxypeptidase und Transkriptionsfaktor identifiziert (Muise et al. 1999). Reznik et al. konnten 2001 nachweisen, dass AEBP1 zwar eine Carboxypeptidaseaktivität besitzt, jedoch keine natürlich vorkommenden Substrate hat und zudem seine Aktivierungsdomäne nicht vollständig funktionsfähig ist (Reznik et al. 2001). Trotzdem ist die enzymatische Domäne essentiell, da sie zur Stabilisierung von AEBP1 als Transkriptionsfaktor entscheidend beiträgt (Liu et al. 2004). AEBP1 ist ein transkriptioneller Inhibitor, der selektiv an das AE-1-Element von Promotoren verschiedener Gene bindet (Muise et al. 1999, Liu et al. 2004, Majdalawieh et al. 2006). So hemmt er die Expression von aP2, einem Gen das in der Differenzierung von Präadipozyten zu adulten Adipozyten eine wichtige Rolle spielt. Dabei ist interessant, dass AEBP1 nur in differenzierenden Präadipozyten, nicht aber in adulten Adipozyten exprimiert wird (Muise et al. 1999, Liu et al. 2004). Ein ähnliches Expressionsmuster findet sich ebenfalls in enddifferenzierten Osteoblasten (Lyons et al. 2006). Zudem wird AEBP1 in verschiedenen Osteosarkomen und Osteosarkomzelllinien differentiell exprimiert (Wilkins et al. 2010). In Präadipozyten konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte AEBP1-Expression zur Hemmung der Differenzierung und verstärkten Proliferation der Zellen führt (Ro et al. 2007). Ein unterstützender Hinweis dafür findet sich auch in einer Arbeit über spermatogene Stammzellen, in denen AEBP1 ebenfalls aufreguliert gefunden wurde (Hamra et al. 2004). Daher kann AEBP1 gegebenenfalls als Stammzellmarker angesehen werden, der im Zuge der Differenzierung exprimiert wird, in enddifferenzierten Zellen aber nicht mehr vorkommt.

Zielgene der AEBP1-vermittelten Transkriptionshemmung sind unter anderem die „orphan nuclear receptors“ PPAR-gamma und LXR-alpha (Majdalawieh et al.

2006). Diese Gene sind an der Hemmung verschiedener Signalwege (NFkB, TGF-beta/AP1, JAK/STAT, WNT/FOXO) als antiinflammatorische Regulatoren beteiligt (Majdalawieh et al. 2006). Die beiden Faktoren können mit TGF-beta interagieren und so AP1 (Villacorta et al. 2007) hemmen. Die Interaktion von PPAR-gamma und LXR-alpha mit WNT hemmt FOXO-Proteine und die Interaktion mit STAT1 und STAT5 kann zur Hemmung von JAK führen (Villacorta et al. 2007). Eine Verbindung zu Elementen der zirkadianen Uhr ist ebenfalls beschrieben worden. So wird PPAR-gamma unter anderem über CLOCK aufreguliert, das wiederum in einer positiven Rückkopplung BMAL, eine funktionale Untereinheit des Proteins CLOCK, aufreguliert (Villacorta et al. 2007). An diesen Prozessen ist auch LXR beteiligt, unter anderem als Regulator von PPAR-gamma. Neben der Regulation der beschriebenen Zielgene gilt AEBP1 als wichtiger Regulator des zellinternen Energiehaushaltes über die Steuerung der Cholesterolumhomöostase (Zhang et al. 2005, Majdalawieh et al. 2006, Ro et al. 2007). Hier sind ebenfalls PPAR-gamma und LXR beteiligt, da diese auch bei der Steuerung des Energiehaushalts und der Homöostase eine entscheidende Rolle spielen (Villacorta et al. 2007). AEBP1 kann neben der Bindung an DNA auch durch Protein-Protein-Interaktion die Funktion von bestimmten Faktoren hemmen. So ist beschrieben, dass AEBP1 an den Tumorsuppressor PTEN binden kann und ihn durch Protein-Protein-Wechselwirkung in seiner Funktionalität beeinträchtigt (Zhang et al. 2005, Ro et al. 2007). Direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen erlauben aber auch die Interaktion von AEBP1 mit übergeordneten Regulatoren wie ERK. So stabilisiert die direkte Interaktion von ERK mit AEBP1 die Aktivität von AEBP1. Interessanterweise zeigen verschiedene Beobachtungen, dass auch die Überexpression von AEBP1 die Aktivität von ERK stabilisiert, so dass die Signaldauer von ERK verlängert wird. Dabei bindet AEBP1 an die gleiche Domäne von ERK wie die ERK-hemmenden DUSPs (DUSP6) und verhindert so die Deaktivierung von ERK (Zhang et al. 2005, Ro et al. 2007). Die Interaktion von ERK mit AEBP1 verstärkt außerdem gleichzeitig die DNA-Bindung von AEBP1. Diese wird aber geschwächt, sobald es zu Phosphorylierung von AEBP1 durch ERK kommt (Lyons et al. 2005). In diesem Zusammenhang wurde 2006 von Lyons et al. daher postuliert, dass AEBP1 lediglich als Kofaktor der Transkription, nicht aber als Transkriptionsfaktor gelten kann, da die DNA-Bindung des Proteins gering

ist. Zudem sei die Bindung des Faktors an Zielgene nicht essentiell für die Ausübung der transkriptionshemmenden Funktion.

AEBP1 ist in den hier durchgeführten Experimenten in HA1ER als Zielgen der RAS-bedingten MEK/ERK-abhängigen und FRA1-vermittelten Transkription bestätigt worden (**Abb. 4.27**). Seine Aufregulierung in HA1ER kann mit einer verstärkten Proliferation der Zellen zusammenhängen. In dem hier gewählten Ansatz und den verwendeten Zelllinien wurden keine bekannten Zielgene von AEBP1 reguliert gefunden, daher bedarf es bezüglich der genauen Funktion von AEBP1 noch einiger Klärung. Interessant wäre hier, die Verknüpfung von AEBP1-PPAR-gamma-AP1 genauer zu betrachten, da es sich hier um eine negative Rückkopplung handeln könnte. Auch die mögliche Konkurrenz mit den ERK-CREB/ATF gesteuerten DUSPs (Blüthgen et al. 2009) wäre interessant, da diese einen Einfluss auf die Stabilität von AEBP1 haben. Die Frage wäre hier auch, ob sich ähnlich wie im Zeitversuch mit U0126 eine Regulation nur in einem bestimmten Zeitfenster nachweisen lässt. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass trotz anhaltender FRA1-Hemmung 96 h nach Ersttransfektion von FRA1-spezifischer siRNA keine signifikanten Effekte bei AEBP1-Zielgenen auftreten. Um dies aufzuklären müssten zeitabhängige Versuche der spezifischen Hemmung von FRA1 und AEBP1 durchgeführt und verglichen werden.

AEBP1 steht über die mögliche Regulation des TGF-beta-/SMAD-Signalwegs auch mit Komponenten des AP1 Komplexes in Verbindung (Villacorta et al. 2007). Neben JUN-Komponenten können auch ATF2 und ATF3 durch TGF-beta stimuliert werden. So findet man in metastasierenden Brustkrebszellen bei konstanter Aktivierung von TGF-beta1 eine Aufregulierung der ATF3-Expression (Kwok et al. 2009). Da hohe ATF3-Level zum Teil mit niedrigen FRA1-Niveaus korrelieren (eigene Daten und Hamdi et al. 2008) ist ein enger Zusammenhang zwischen der Regulierung von FRA1, AEBP1 und einer Stabilisierung der Signaltransduktion über ERK und damit von FRA1 im AP1-Komplex gegeben (**Abb. 5.4**).

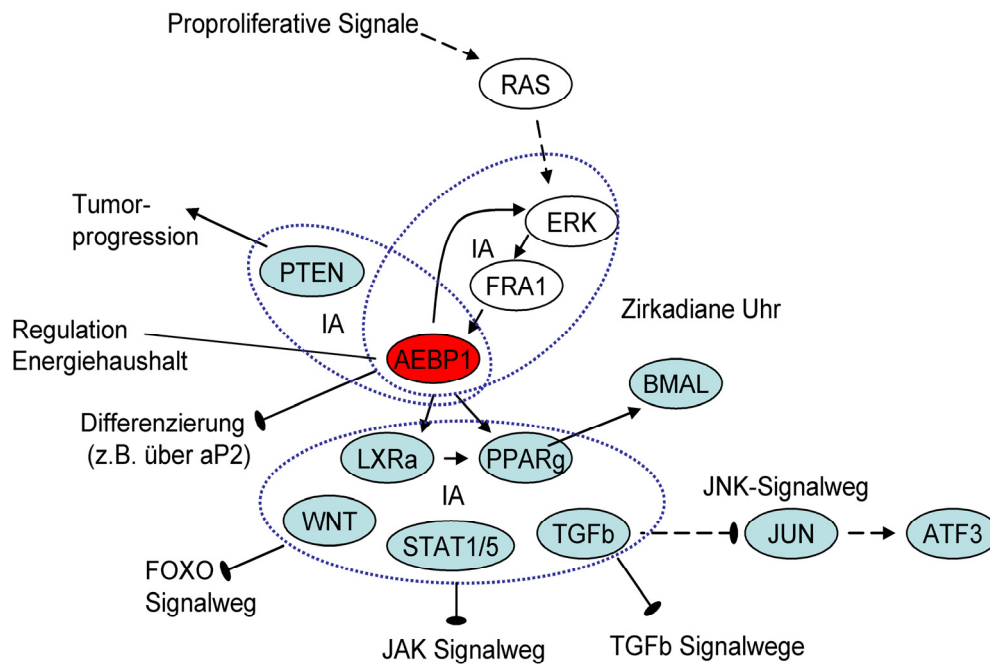


Abb. 5.4: AEBP1 abhängig gesteuerte Funktionen

Blaue Kreise/IA bezeichnen direkte Protein-Protein-Interaktionen

NPAS2

Als weiteres positives Zielgen der FRA1-abhängigen Transkription wurde der zirkadiane Transkriptionsfaktor NPAS2 identifiziert. Er gehört zu den neun zentralen Proteinen der zirkadianen Uhr (Yi et al. 2009). NPAS2 ist ein BZIP-Transkriptionsfaktor, der als Heterodimer mit BMAL, einem weiteren zirkadianen Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene steuert (Rutter et al. 2001, Boehning et al. 2002). Zu diesen gehören die zirkadianen Gene PER1 und 2 sowie CRY1 und 2. Die zirkadianen Gene unterliegen komplexen gegenseitigen Regulationen mit positiven und negativen Rückkopplungen (**Abb. 5.5**). NPAS2 bildet einen Komplex mit BMAL in Konkurrenz zu CLOCK, einem strukturell ähnlichen zirkadianen Faktor (Rutter et al. 2001, Reick et al. 2001). Der NPAS2:BMAL-Komplex führt zur Transkription von CRY1 und CRY2, die in Folge CLOCK hemmen (Kondratov et al. 2006) und damit das Gleichgewicht des Heterodimers zugunsten von NPAS2:BMAL verschieben. Zusätzlich existieren mehrere negative Rückkopplungsschleifen. So führt eine Überexpression von NPAS2 zu einer transkriptionellen Hemmung von BMAL (Reick et al.

2001) und die Expressionsregulierung der Zielgene PER1 und PER2 führt in Folge zur Hemmung von NPAS2:BMAL (Bertolucci et al. 2008). Die Expression von PER1 und 2 führt zudem zu einer Veränderung des Apoptosegleichgewichts zugunsten der Apoptose und ist damit in die Überlebens- und Proliferationskontrolle von Zellen eingebunden (Chen-Goodspeed et al. 2007) (**Abb. 5.5**). Damit besteht ein funktioneller Zusammenhang zu FRA1, dessen Regulation ebenfalls in die Proliferationskontrolle von Zellen eingebunden ist, was in der vorliegenden Arbeit auch bestätigt werden konnte. Ein weiterer Zusammenhang ist durch verschiedene Arbeiten gegeben, die NPAS2 in die Regulation der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur einordnen (Yi et al. 2009, Hoffman et al. 2008, Fu et al. 2002). So vermittelt NPAS2:BMAL unter anderem die cMYC-Repression und entsprechend nachfolgend auch eine Hemmung der pro-onkogenen Effekte dieses Transkriptionsfaktors, wie z.B. genetische Instabilität (Prochownik et al. 2008). In Yi et al. 2009 sind zudem Zielgene von NPAS2 publiziert worden (CDC25A,POU4F2), die zum Teil eine direkte Funktion in der Zellzykluskontrolle ausüben.

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass NPAS2 neben der zirkadianen Regulation auch, ähnlich wie AEBP1, in die metabolische Regulation von Zellen eingreift (Wu et al. 2010, Kaneko et al. 2009, Englund et al. 2009). NPAS2 ist z.B. über NAD und NADH induzierbar (Rutter et al. 2001) und kann über CO inhibiert werden (Dioum et al. 2002). Im Zusammenhang mit der Regulation von AEBP1 ist damit ein Hinweis auf den bisher wenig charakterisierten Mechanismus der FRA1-abhängigen Stoffwechselkontrolle gegeben.

Verschiedene Polymorphismen des NPAS2-Gens spielen bei der Entwicklung von Brust- und Prostatakarzinomen eine Rolle, außerdem bei der Entstehung von Non-Hodgkin-Lymphomen (Zhu et al. 2008, Chu et al. 2008, Zhu et al. 2007). Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer exakten Regulierung und Funktionalität von NPAS2.

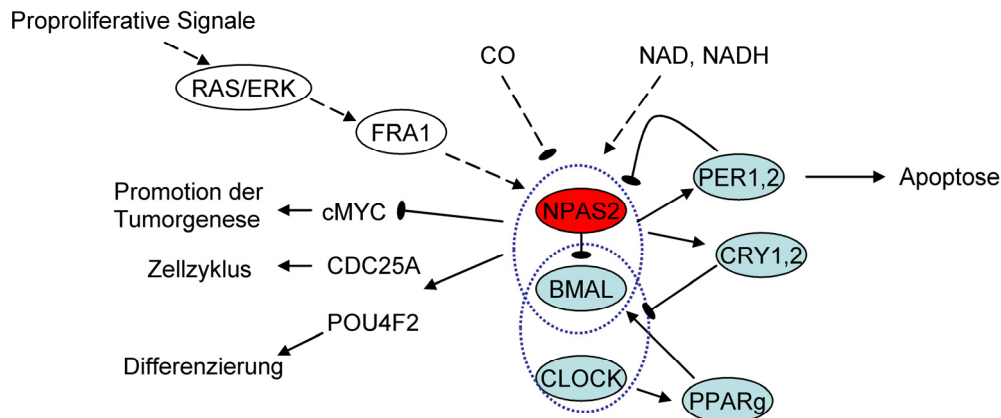


Abb. 5.5: NPAS2 Funktionen

Blaue Kreise stehen für Komplexbildungen

TCFL5

TCFL5 ist ebenfalls als positiv von FRA1 reguliertes Zielgen identifiziert worden. Er ist ein BZIP-Transkriptionsfaktor, der im Rahmen der Spermatogenese eine Rolle spielt (Siep et al. 2004). Er wurde in TEL/AML-positiven Prostatakarzinomen differentiell exprimiert gefunden (Gandemer et al. 2007). Das Fusionsgen TEL/AML1 führt zu einer verstärkten Differenzierung von Zellen (Pine et al. 2003), daher könnte TCFL5 funktionell an Differenzierungsprozesse gekoppelt und so in einem ähnlichen Kontext wie AEBP1 in Adipozyten auftreten. Um dies abzusichern wären weitere Experimente notwendig. Es ist bekannt, dass TCFL5 ein Gegenspieler des Transkriptionsfaktors USF1 ist (Rodriguez et al. 2003) und dessen Funktion in der Zellzykluskontrolle behindert. Es ist gezeigt worden, dass TCFL5 den Promoter von CD2 in ruhenden Zellen bindet, jedoch nicht in mitotischen (Rodriguez et al. 2003). Dies lässt auf eine zellzyklusfördernde Rolle schließen, da USF und CD2 den Zellzyklus hemmen (Rodriguez et al. 2003). Dies stünde in Einklang mit der zellzyklusfördernden Funktion von FRA1.

YWHAZ

YWHAZ ist in HA1ER als schwaches Zielgen von FRA1 validiert worden. Er wurde durch die GSEA-GO-Analyse als Transkriptionsfaktor identifiziert, jedoch deutet Obsil et al. 2003 an, dass YWHAZ wahrscheinlich eine Kofaktorfunktion bei der Transkription einnimmt. YWHAZ ist als 14-3-3-Protein in die Signaltransduktion eingebunden, sowohl als „Scaffold“-Protein von SHC (Barry et al. 2009) als auch als EGFR-Interaktionspartner (Oksvold et al. 2004). Er ist außerdem an der Phosphorylierung von MAPKAP2 beteiligt und so in die stressvermittelte Aktivierung von P38 und JNK eingebunden (Powell et al. 2003). Es ist gezeigt worden, dass YWHAZ durch den ER-Inhibitor Tamoxifen induziert werden kann (Frasor et al. 2006). Daneben wurde publiziert, dass YWHAZ ein positives Zielgen der PI3K/AKT-vermittelten Signaltransduktion ist (Powell et al. 2003) und durch proliferatorische und apoptotische Signale herunterreguliert wird.

YWHAZ ist in verschiedenen Krebsformen als differentiell reguliert beschrieben worden, so in Kopf-Hals Karzinomen (Lin et al. 2009), Mundhöhlenkarzinomen (Matta et al. 2009) und, wie FRA1, in Lungenkarzinomen (Li et al. 2008). Zudem ist ein Zusammenhang mit der ErbB-vermittelten epithelial-mesenchymalen Transition in Brustepithelien nachgewiesen worden (Luo et al. 2009). Da sowohl in Lungen, als auch in Brustkarzinomen eine differentielle Regulierung von FRA1 nachgewiesen worden ist (Verde et al. 2007, Milde-Langosch et al. 2005), lässt sich die differentielle Regulierung von YWHAZ mit diesen Daten in Einklang bringen.

Neben diesen neuen Zielgenen wurden auch bereits bekannte Zielgene von FRA1, FRA1, CCND1 und VEGF, verifiziert. Die Funktionen dieser Gene sind hinreichend bekannt und zum Teil bereits im Kapitel 1 beschrieben worden, daher wird an dieser Stelle davon abgesehen, ihre Funktion ein weiteres Mal zu diskutieren.

Die Identifizierung und Validierung neuer Zielgene der RAS-FRA1-abhängigen Transkription führte zu neuen Einblicken in die Mechanismen der FRA1-abhängigen Steuerung verschiedener Zellfunktionen (**Abb. 5.6**). Über AEBP1 und TCFL5 konnte eine Rolle von FRA1 für die Differenzierung erhärtet werden. Die Funktionen von

AEBP1 und NPAS2 zeigen die Verbindung von FRA1 mit der zellinternen Stoffwechselkontrolle auf. Daneben sind YWHAZ und AEBP1 in wichtige Rückkopplungsschleifen verschiedener Signalwege (EGFR, TFGbeta, WNT, JAK/STAT, PI3K) involviert, die so bisher noch nicht als RAS-FRA1-abhängig beschrieben worden sind. Die Rolle der FRA1-abhängigen Transkription für die Regulation des zirkadianen Netzwerks ist seit einiger Zeit bekannt (Schwartz et al. 2000, Herzel et al. unveröffentlichte Daten), konnte aber erst über NPAS2 und AEBP1 als FRA1-Zielgenen genauer charakterisiert werden.

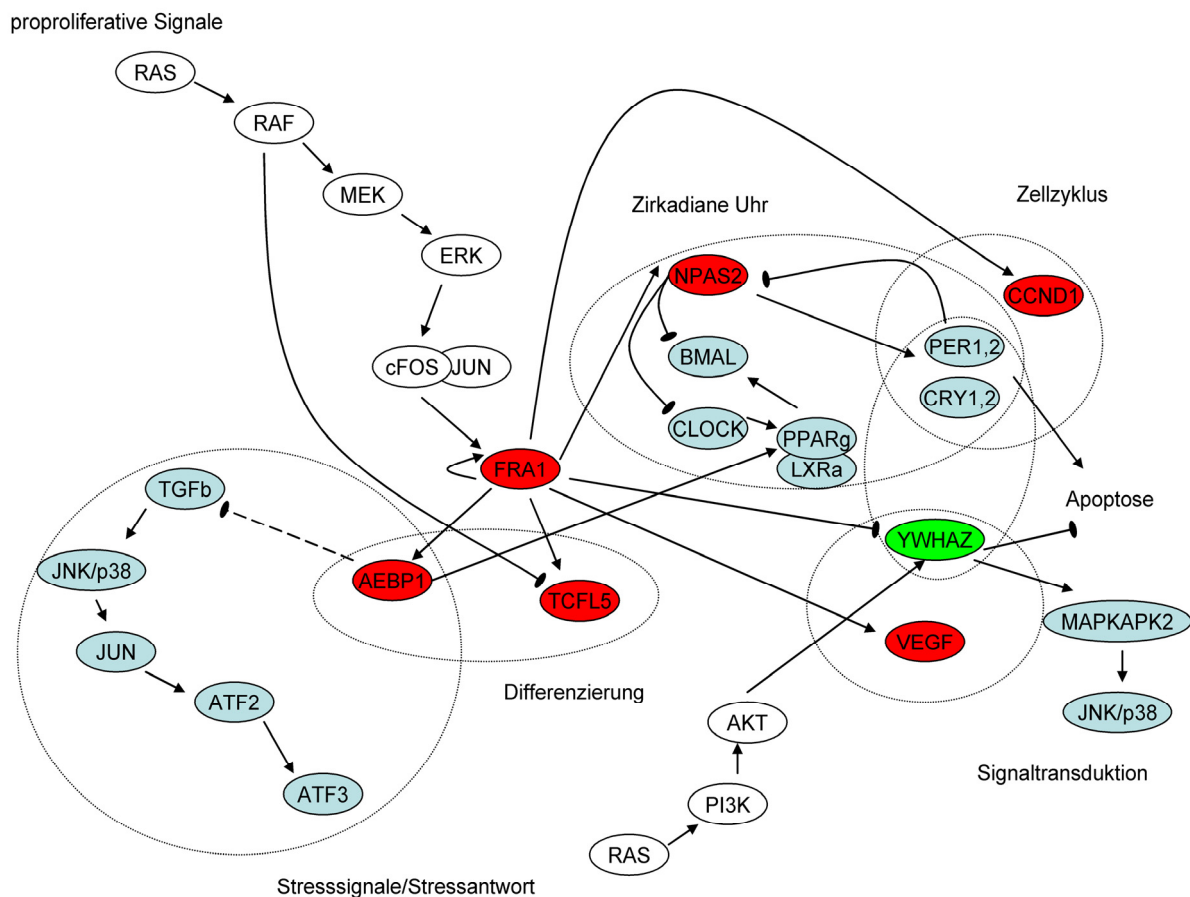


Abb. 5.6: RAS-FRA1-abhängig gesteuertes transkriptionelles Netzwerk unter Einbindung der neu identifizierten FRA1-Zielgene

5.1.7 Der mögliche Einfluss anderer Transkriptionsfaktoren und epigenetischer Regulatoren auf FRA1-Zielgene und mögliche Interaktionen von Zielgenen

Innerhalb der GSEA- und TRAP-Analyse der FRA1- Zielgene war es möglich, zusätzlich zu FRA1 weitere mögliche Regulatoren zu identifizieren, die bei der Regulation der Gene möglicherweise eine Rolle spielen (**Tab. 4.19**, Kapitel 4.4.5). Wie in den Tabellen **Tab. 4.22** dargestellt, wurde an FRA1-Zielgenen in HA1EB Bindestellen für eine Reihe immunassoziiierter Transkriptionsfaktoren (IRF1, IRF7, OCT, POU3F2, NFkB) gefunden, die möglicherweise mit den in HA1EB identifizierten FRA1-abhängigen Genen der Immunantwort (IFIT1, ISG15, OAS1, OAS2, OASL) in Zusammenhang stehen. Auch in HA1ER sind FRA1-abhängige stress- und immunassoziierte Gene identifiziert worden (FOXO1 und FOXP1). Diese können ebenfalls möglicherweise mit einem Transkriptionsfaktor der Immunantwort (IRF7) im Zusammenhang stehen, da dieser in HA1ER als bindender Faktor an FRA1-Zielgenen identifiziert wurde. Daneben sind auch Interaktionen der FRA1-abhängig regulierten Gene innerhalb von Rückkopplungsschleifen möglich. So hemmt zum Beispiel YWHAZ die WNT-vermittelte FOXO-Protein-Expression (Obsil et al. 2003) und auch AEBP1 ist über PPAR-gamma und LXR-alpha an der Hemmung des WNT-Signalwegs beteiligt (Villacorta et al. 2007).

Eine mögliche Verbindung zur Regulation epigenetischer Prozesse wurde ebenfalls charakterisiert. In den immortalen HA1EB wurden Isoformen der Histone H1 und H2 als Zielgene der FRA1-abhängigen Transkription identifiziert (**Tab. 4. 19**). Ihre Expression wird nach der FRA1-Hemmung in HA1EB stark aufreguliert, was für einen hemmenden Einfluss der FRA1-Expression spricht. Interessanterweise ist dies in HA1ER nicht zu beobachten. Dagegen wurde hier PHF1 als FRA1-abhängig aufregulierter Faktor identifiziert (**Abb. 4.20**). PHF1 reguliert das Gen EZH2, eine Histonmethyltransferase, welche die aktivierende Methylierung von Histon H3 K27 katalysiert. Insofern könnte in den HA1EB FRA1 als direkter Transkriptionsregulator von Histonen eine Rolle spielen und in HA1ER an der posttranslationalen Modifikation der Histone beteiligt sein. Die Expressionsanalyse von PHF1 zeigt allerdings (**Tab.4. 18**) keine signifikante Regulation nach FRA1-Hemmung und auch EZH2 ist

in HA1ER nicht reguliert. Daher kann die Verbindung von FRA1 zu posttranslationalen Modifikationen von Histonen in HA1ER nicht sicher belegt werden.

5.2 Kritische Betrachtung der Versuchsanordnung, der angewandten Methoden und des verwendeten Zellsystems

5.2.1 Kombination von experimentellen und bioinformatischen Methoden

Zur Dechiffrierung von regulatorischen und transkriptionellen Netzwerken können verschiedenen Ansätze und Methoden verwendet werden. Dazu gehören experimentelle Arbeiten mit Kombinationen von Expressionsprofilen mit direkten Protein-DNA-Interaktionen wie ChIP oder ChIP-CHIP und ChIP-Seq (Scharer et al. 2009, Kim et al. 2009, Tomaru et al. 2009, Quin et al. 2009) sowie bioinformatische Arbeiten zur Modellierung von Netzwerken (Niida et al. 2009, Wang et al. 2009, Manke et al. 2003). Bisher wurden allerdings wenige Arbeiten durchgeführt, die einen umfassenden unvoreingenommenen Einblick in das Verhalten transkriptioneller Netzwerke ermöglichen, da meist von vornherein bestimmte Transkriptionsfaktoren im Fokus standen (Quin et al. 2009, Kim et al. 2009, Scharer et al. 2009) und diese meist nicht vergleichend in verschiedenen Zellumgebungen (bspw. maligne, benigne) untersucht wurden (Tomaru et al. 2009, Scharer et al. 2009, Quin et al. 2009). Zudem sind die verwendeten Zelllinien häufig von Tumoren abgeleitet, was aufgrund der meist unvollständigen Zellcharakterisierung keine eindeutigen Aussagen über Mechanismen zulässt.

Bei der Verwendung bioinformatischer Methoden fällt auf, dass keine der zitierten Arbeiten in der Analyse der Zielgene Methoden wie TRAP, GSEA oder GO durchgeführt hat um weiterführende und charakterisierende Informationen zu den Zielgenen bestimmter Transkriptionsfaktoren zu ermitteln. Zudem ist in den meisten Fällen darauf verzichtet worden, erhobene Daten aus ChIP-seq oder ChIP-CHIP noch einmal im Einzelexperiment zu validieren.

Im Gegensatz dazu verfolgt die vorliegende Arbeit einen umfassenden und übertragbaren Ansatz zur Aufklärung transkriptioneller Netzwerke. Die genomweite Erstellung von Expressionsprofilen in immortalen und HRAS-transformierten Zellen

ermöglicht einen Vergleich regulierter Gene in benigner und maligner Zellumgebung. Zudem sind die verwendeten Zelllinien HA1EB und HA1ER künstlich generiert und gut charakterisiert (Hahn et al. 1999 und 2002), was eine Interpretation von Ergebnissen auf dem spezifischen genetischen Hintergrund der Zellen vereinfacht. So können Effekte aufgrund der RAS-Aktivierung und von verschiedenen Behandlungen klarer von Effekten chromosomaler Alterationen oder genetischer Veränderungen abgegrenzt werden als dies in Zelllinien mit Tumorphintergrund möglich ist, da hier auch unbekannte genetische Veränderungen eine Rolle spielen können. Bei der Untersuchung wurden neben genomweiten Studien in jeder Phase der Arbeit Einzelexperimente durchgeführt. Zudem wurden die Effekte von Behandlungen (siRNA, U0126) zusätzlich auf phänotypischer Ebene überprüft. Diese Maßnahmen erhöhen die Sicherheit gegenüber gemessenen Daten in den genomweiten Studien.

Die Integration der bioinformatischen Methoden TRAP und GSEA sowie GO ermöglichte eine schnelle Interpretation der erhobenen Daten bezüglich der Funktionalität der Zielgene und die mögliche Unterscheidung in direkte und indirekte Zielgene. Zudem konnten Zielgene mittels GSEA in einen bereits experimentell gesicherten Zusammenhang mit den Transkriptionsfaktoren gebracht werden. So verbessern die angewandten bioinformatischen Methoden die Aussagekraft der Daten über eine bessere Auflösung in Betracht zu ziehender Parameter (sichere Datenlage, direkte/indirekte Zielgene, bekannte Funktionen). Darüber hinaus ist es möglich, mit den angewandten Methoden weitere, interagierende Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die an der Zielgenregulation spezifischer Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (Kapitel 4.4.5).

Die Einzelgenvalidierungen mittels qPCR und ChIP zeigen, dass mögliche Zielgene aus den Microarraystudien und bioinformatischen Analysen immer eine biologische Überprüfung benötigen, da sich, wie in Kapitel 4.4.6 beschrieben, lediglich ein bestimmter Prozentsatz der potentiellen Zielgene auch verifizieren lässt.

5.2.2 Die Verwendung des Zellpaares HA1EB und HA1ER

Das künstlich generierte Zellpaar HA1EB und HA1ER wurde 1999 als Analysesystem minimal nötiger Mutationen für eine onkogene Transformation publiziert (Hahn et al. 1999 und 2002). Die stabile Transfektion spezifischer genetischer Elemente (SV40-ER, HTERT, H RAS^{V12}) schafft einen klaren genetischen Hintergrund. Aufgrund der begrenzten veränderten Parameter der beiden Zellsysteme sind Ergebnisse nicht auf die Tumorsituation übertragbar, da in dieser wesentlich mehr Veränderungen des Genoms, Translokationen, Deletionen, Chromosomaberration und Folgemutationen (Weinberg 2006, Stratton et al. 2009, Hanahan et al. 2000) zur onkogenen Transformation beitragen. Zudem muss in Tumoren die Tumor-Stroma-Interaktion ebenfalls in Betracht gezogen werden, da Tumore nicht isoliert vorliegen.

Die Eignung von HA1EB und HA1ER zur Zielgenanalyse der RAS-vermittelten Transkription konnte in der vorliegenden Arbeit nur zum Teil bestätigt werden. Im Ursprungslabor wurde postuliert, dass die Zellen diploid bzw. nahe-diploid seien (Hahn et al. 1999, 2002, Zimonjic et al. 2001). Eine Untersuchung von Stindl 2002 zeigte jedoch, dass die Zellen innerhalb von wenigen Tagen in Kultur zum größten Teil aneuploid werden und Translokationen sowie andere Alterationen zeigen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte zum Teil nicht eine direkte Folge von HRAS^{V12}, HTERT und SV40-ER sind, sondern durch andere genetische Alterationen zustande kommen. Hinzu kam die Beobachtung, dass HA1EB und HA1ER eine Tendenz zur morphologischen Angleichung innerhalb der Kultivierung (>10 Passagen) zeigen und dann nur schlecht unterscheidbar sind. Dieser Effekt konnte durch Einfrieren und erneutes Auftauen revertiert werden. Dies könnte mit einem höheren Selektionsdruck unter Einfrier- und Auftaubedingungen zusammenhängen. Die Aktivierung der RAS-ERK-Kaskade war von dieser Angleichung ebenfalls betroffen.

Bei den siRNA-Experimenten fiel die starke Sensibilität der Zellen gegenüber der Transfektion auf. Neben Oligofektamin zeigte lediglich Primefect in einem Konzentrationsbereich von 2-2,5 µl/6well keine toxischen Effekte. Andere getestete Transfektionsmöglichkeiten (Lipofectamin, Amaxa) oder höhere Konzentrationen führten zum Absterben der Zellen.

Bei nichthumanen Zelllinien kann ein Effekt auf genetischer Ebene häufig auf morphologischer Ebene nachvollzogen werden (Raudies et al. 2005, Tchernitsa et al. 2004). Dies war beim verwendeten humanen Zellpaar nicht der Fall. Phänotypische Unterschiede konnten hier lediglich im Bezug auf dreidimensionales Wachstum gemessen werden (Kapitel 4.1.1 und 4.4.1). Dies ist für die meisten Zellen humanen Ursprungs der Fall, erschwert jedoch die visuelle Auswertung von Experimenten im Vergleich mit nichthumanen Zellen.

Zusammenfassend muss daher geschlossen werden, dass sich die Zelllinien insbesondere aufgrund der Handhabung in der Kultivierung, ihrer geringen Robustheit gegenüber direkten genetischen Eingriffen (siRNA) und ihres z.T. unklaren Genotyps lediglich bedingt als vergleichendes Testsystem eignen.

5.2.3 Der MEK/ERK- Inhibitor U0126

U0126 ist ein gut charakterisierter Inhibitor der MEK-ERK-Kaskade (English et al. 2002, Fatawa et al. 1998, Duncia et al. 1998), der die Aktivierung von ERK effektiv hemmt. Dies konnte bestätigt werden (Ha-Thi - unveröffentlichte Daten, Kapitel 4.1.3). Nach Duncia et al. 1998 und Fatava et al. 1998 ist der Inhibitor in Zellkultur stabil - allerdings haben praktische Erfahrungen gezeigt, dass U0126 nur 48 h unter Kulturbedingungen aktiv ist. Aus diesem Grund konnten keine U0126-behandelten Softagarassays durchgeführt werden, da hier keine kontinuierliche homogene U0126-Zufuhr möglich war.

Der Inhibitor wird in DMSO gelöst. Friend et al. 1971 und Carvalho et al. 1998 haben gezeigt, dass sich DMSO auf die Zytoskelettstruktur auswirkt und Zytodifferenzierung sowie Wachstumshemmung auslösen kann (Tanaka et al. 1975). Es ist daher möglich, dass ein Teil der gemessenen U0126-Effekte auf die Behandlung mit DMSO zurückzuführen ist. Zur Kontrolle wurden daher DMSO-behandelte Proben mitgeführt. In den meisten Fällen hatte DMSO keinen starken Einfluss auf die Expression oder die Modifikation der analysierten Moleküle, global jedoch konnte ein Effekt aufgrund der Messdaten des Microarrays gezeigt werden. Alternativen zu U0126 als Lösungsmittel (Wityak 2004) wurden nicht untersucht.

5.2.4 Bewertung der transienten siRNA vermittelten Hemmung

Die Verwendung von siRNA zur Hemmung spezifischer Gene ist eine seit 1998 (Fire et al. 1998, Elbashir et al. 2001) dokumentierte Methode, die aufgrund des klaren zugrunde liegenden Mechanismus und der hohen Effektivität häufig für die spezifische Beeinflussung von Genen genutzt wird. Der Transfer von siRNA in tierische Zellen kann durch verschiedene Methoden vermittelt werden (**Kapitel. 3.3.2**). In der vorliegenden Arbeit wurde mit lipophiler Transfektion gearbeitet, da die Elektroporation keine signifikanten Transfektionsraten zeigte.

Bei der Datenanalyse der Microarrays wurde festgestellt, dass die Messwerte der SCR-Kontrollen mitunter starke Abweichungen gegenüber BLIND und auch gegenüber einander zeigten (siehe **Kapitel 4.3.1** und **4.4.2**). Unspezifische Effekte bei der SCR- siRNA-Transfektion von Zellen sind wenig untersucht worden (Persegeniev et al. 2004) und können bisher nicht erklärt werden, da SCR-siRNAs keine Homologie zu funktionellen DNA-Abschnitten zeigen. Daher wurde in die Bewertung der Genregulation durch siRNA-Behandlung (siehe **Kapitel 4.4.6**) sowohl der Unterschied zu SCR als auch zur BLIND-Kontrolle einbezogen. Interessanterweise kam es auch bei der Analyse der BLIND-Kontrollen zum Teil zu einer veränderten Genexpression gegenüber unbehandelten Zellen (siehe **Kapitel 4.4.6, Tab. 4.11**). Dies kann mit veränderten Kultivierungsbedingungen begründet werden, da die Zellen für die Transfektionen (BLIND) unter Minimalbedingungen (OptiMEM, 10 % IFS, Transfektionsreagenz 1:750) und nicht im normalen Kulturmedium (**Kapitel. 3.1.**) kultiviert werden. Die Ergebnisse in Kapitel 4.4.6 zeigen deutlich, dass selbst wenn die Transfektion keine zytotoxischen Effekte auf die Zellen zeigt, es zur Veränderung der Expression verschiedener Gene kommt, die möglicherweise stressbedingt ist. Daher wird für künftige Experimente vorgeschlagen, neben SCR und BLIND-Kontrolle auch unbehandelte Kontrollen unter Kulturbedingungen in die Experimente einzuschließen.

5.2.5 Bewertung der GO-, GSEA und TRAP-Analysen

GO-Analyse

Die GO-Analysen (einschließlich der GSEA-basierten GO-Analyse) wurden mit Hilfe des Online-Werkzeugs DAVID (Huang et al. 2009, Dennis et al. 2003, Gene ontology consortium 2000) durchgeführt und nach „Biological function“ sowie Schlagwörtern wie „Transcription factor activity“, „Transcription activator activity“ und „Transcription repressor activity“ durchsucht. Die Ergebnisse waren zur Bestimmung der Funktionalität der Gene gut geeignet. Allerdings wurde festgestellt, dass die Annotationen für einzelne Gene mitunter ungenau waren. So wurden die Transkriptionsfaktoren TCF8 und NCOA2 sowohl als Repressoren, als auch als Aktivatoren der Transkription annotiert. Zudem wurde der Transkriptionsfaktor SOX9 zwar als Aktivator der Transkription, jedoch nicht als Transkriptionsfaktor annotiert (**Anhang Tab. II**).

GSEA und TRAP

Eine eingehende Diskussion der GSEA und TRAP-Methoden wird an dieser Stelle nicht vorgenommen, da diese Analyse in Kooperation mit dem Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin durch Ewa Szczurek und Szymon Kielbasa durchgeführt wurden. Grundlage der Methoden bilden die Veröffentlichungen Subramanian et al. 2005 (GSEA) und Manke et al. 2008 (TRAP). Für den Rückschluss der Ergebnisse dieser zwei Methoden auf biologisch relevante Informationen haben sich beide Methoden als wertvoll erwiesen. Zum einen konnten direkte von indirekten Zielgenen unterschieden werden (TRAP), zum anderen mittels der GSEA-Analyse Rückschlüsse auf bereits beschriebene Gengruppen gezogen werden. Allerdings werden in beiden Methoden die verschiedenen IDs für einzelne Gene einzeln betrachtet und die Gesamtinformation für verschiedene Gene muss nach der Analyse manuell zusammengefasst werden. Für Gene, bei denen IDs stark abweichende Ergebnisse zeigten, ergab sich keine konsistente Information. So konnten einige Zielgene von FRA1 (SMARCA4, PAX8, TCF3), die eindeutig in der GSEA-Analyse zu einem regulierten Datenset zugeordnet werden konnten, nicht bzw. nur teilweise in ihrer Regulation bestätigt werden.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des bearbeiteten Projektes ist es gelungen, das RAS-abhängige transkriptionale Netzwerk unterhalb von MEK/ERK um direkte und indirekte Zielgene von SRF, FRA1 und ELK3 zu erweitern und so zur Dechiffrierung des transkriptionalen Netzwerks beizutragen. Der größte Teil der analysierten transkriptionsabhängigen Gene umfasste potentielle Zielgene von FRA1, jedoch wurden auch Zielgene von SRF und ELK3 sowie potentielle alternative Regulatoren der entsprechenden Zielgene identifiziert. Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine hierarchische Verbindung zwischen SRF, ELK3 und FRA1 nachgewiesen werden, allerdings bilden die drei Transkriptionsfaktoren ein gemeinsames RAS-abhängiges Netzwerk bei der Regulierung bestimmter Zielgene.

Das Netzwerk unterhalb von FRA1 wurde einer genaueren Untersuchung unterzogen bei der von 38 getesteten Zielgenen fünf (FRA1, AEBP1, TCFL5, YWHAZ, NPAS2) direkt verifiziert werden konnten. Zwei weitere Gene, die in der Literatur als FRA1-Zielgene beschrieben sind, wurden über ChIP validiert und können dem FRA1-abhängigen Netzwerk hinzugefügt werden. Innerhalb des Netzwerks konnten verschiedene publizierte FRA1-Funktionen wie Regulation der Proliferation, Differenzierung und der zirkadianen Uhr über die spezifischen Funktionen der neu identifizierten Zielgene genauer charakterisiert werden. Zusätzlich wurden neue mögliche Verbindungen zur Regulation epigenetischer Prozesse, des Metabolismus und der Apoptose sowie Rückkopplungen in verschiedene Signalwege (WNT, TGFbeta, JAK/STAT, PI3K, RHO) identifiziert. Diese können in weiterführenden Analysen näher charakterisiert werden. Außerdem wäre interessant, die Analyse, wie sie hier für FRA1 durchgeführt wurde, auch an den erhobenen Daten für SRF und ELK3 abhängigen Genen der RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade durchzuführen um so einen genaueren Einblick in das von dieser Kaskade gesteuerte transkriptionelle Netzwerk zu gewinnen.

i Literaturverzeichnis

Aguilera,O., Fernandez,A.F., Munoz,A. and Fraga,M.F. (2010) *Epigenetics and environment: a complex relationship*. J. Appl. Physiol, 109, 243-251.

Alexopoulos,L.G., Youn,I., Bonaldo,P. and Guilak,F. (2009) *Developmental and osteoarthritic changes in Col6a1-knockout mice: biomechanics of type VI collagen in the cartilage pericellular matrix*. Arthritis Rheum., 60, 771-779.

Andersen,D.S. and Tapon,N. (2008) *Drosophila MFAP1 is required for pre-mRNA processing and G2/M progression*. J. Biol. Chem., 283, 31256-31267.

Angel,P. and Karin,M. (1991) *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. Biochim. Biophys. Acta, 1072, 129-157.

Ashida,R., Tominaga,K., Sasaki,E., Watanabe,T., Fujiwara,Y., Oshitani,N., Higuchi,K., Mitsuyama,S., Iwao,H. and Arakawa,T. (2005) *AP-1 and colorectal cancer*. Inflammopharmacology., 13, 113-125.

Baker,L.A., Allis,C.D. and Wang,G.G. (2008) *PHD fingers in human diseases: disorders arising from misinterpreting epigenetic marks*. Mutat. Res., 647, 3-12.

Barry,E.F., Felquer,F.A., Powell,J.A., Biggs,L., Stomski,F.C., Urbani,A., Ramshaw,H., Hoffmann,P., Wilce,M.C., Grimbaldston,M.A., Lopez,A.F. and Guthridge,M.A. (2009) *14-3-3:Shc scaffolds integrate phosphoserine and phosphotyrosine signaling to regulate phosphatidylinositol 3-kinase activation and cell survival*. J. Biol. Chem., 284, 12080-12090.

Basbous,J., Chalbos,D., Hipskind,R., Jariel-Encontre,I. and Piechaczyk,M. (2007) *Ubiquitin-independent proteasomal degradation of Fra-1 is antagonized by Erk1/2 pathway-mediated phosphorylation of a unique C-terminal destabilizer*. Mol. Cell Biol., 27, 3936-3950.

Battista,S., Fedele,M., Martinez,H.J., Pentimalli,F., Pierantoni,G.M., Visone,R., De,M., I, Croce,C.M. and Fusco,A. (2005) *High-mobility-group A1 (HMGA1) proteins down-regulate the expression of the recombination activating gene 2 (RAG2)*. Biochem. J., 389, 91-97.

-
- Beerenwinkel,N., Antal,T., Dingli,D., Traulsen,A., Kinzler,K.W., Velculescu,V.E., Vogelstein,B. and Nowak,M.A.** (2007) *Genetic progression and the waiting time to cancer*. PLoS. Comput. Biol., 3, e225.
- Berchtold,M.W., Egli,R., Rhyner,J.A., Hameister,H. and Strehler,E.E.** (1993) *Localization of the human bona fide calmodulin genes CALM1, CALM2, and CALM3 to chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3*. Genomics, 16, 461-465.
- Bergers,G., Graninger,P., Braselmann,S., Wrighton,C. and Busslinger,M.** (1995) *Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron*. Mol. Cell Biol., 15, 3748-3758.
- Bertolucci,C., Cavallari,N., Colognesi,I., Aguzzi,J., Chen,Z., Caruso,P., Foa,A., Tosini,G., Bernardi,F. and Pinotti,M.** (2008) *Evidence for an overlapping role of CLOCK and NPAS2 transcription factors in liver circadian oscillators*. Mol. Cell Biol., 28, 3070-3075.
- Bhinge,A.A., Kim,J., Euskirchen,G.M., Snyder,M. and Iyer,V.R.** (2007) *Mapping the chromosomal targets of STAT1 by Sequence Tag Analysis of Genomic Enrichment (STAGE)*. Genome Res., 17, 910-916.
- Bishop,J.M.** (1987) *The molecular genetics of cancer*. Science, 235, 305-311.
- Bishop,J.M.** (1991) *Molecular themes in oncogenesis*. Cell, 64, 235-248.
- Bluthgen,N., Legewie,S., Kielbasa,S.M., Schramme,A., Tchernitsa,O., Keil,J., Solf,A., Vingron,M., Schafer,R., Herzog,H. and Sers,C.** (2009) *A systems biological approach suggests that transcriptional feedback regulation by dual-specificity phosphatase 6 shapes extracellular signal-related kinase activity in RAS-transformed fibroblasts*. FEBS J., 276, 1024-1035.
- Boehning,D. and Snyder,S.H.** (2002) *Circadian rhythms. Carbon monoxide and clocks*. Science, 298, 2339-2340.
- Bonomini,F., Filippini,F., Hayek,T., Aviram,M., Keidar,S., Rodella,L.F., Coleman,R. and Rezzani,R.** (2010) *Apolipoprotein E and its role in aging and survival*. Exp. Gerontol., 45, 149-157.
- Bouchelouche,K., Choyke,P.L. and Capala,J.** (2010) *Prostate specific membrane antigen- a target for imaging and therapy with radionuclides*. Discov. Med., 9, 55-61.
- Bright,M.D., Garner,A.P. and Ridley,A.J.** (2009) *PAK1 and PAK2 have different roles in HGF-induced morphological responses*. Cell Signal., 21, 1738-1747.
- Buchwalter,G., Gross,C. and Wasylyk,B.** (2004) *Ets ternary complex transcription factors*. Gene , 324, 1-14.

Buchwalter,G., Gross,C. and Wasylyk,B. (2005) *The ternary complex factor Net regulates cell migration through inhibition of PAI-1 expression.* Mol. Cell Biol., 25, 10853-10862.

Cai,Y., Zhang,C., Nawa,T., Aso,T., Tanaka,M., Oshiro,S., Ichijo,H. and Kitajima,S. (2000) *Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and promoter response element.* Blood, 96, 2140-2148.

Cao,Y., Vo,T., Millien,G., Tagne,J.B., Kotton,D., Mason,R.J., Williams,M.C. and Ramirez,M.I. (2010) *Epigenetic mechanisms modulate thyroid transcription factor 1-mediated transcription of the surfactant protein B gene.* J. Biol. Chem., 285, 2152-2164.

Carvalho,L., Foulkes,K. and Mickey,D.D. (1989) *Effect of DMSO and DFMO on rat prostate tumor growth.* Prostate, 15, 123-133.

Casalino,L., De,C.D. and Verde,P. (2003) *Accumulation of Fra-1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization.* Mol. Cell Biol., 23, 4401-4415.

Castellano,E., De Las,R.J., Guerrero,C. and Santos,E. (2007) *Transcriptional networks of knockout cell lines identify functional specificities of H-Ras and N-Ras: significant involvement of N-Ras in biotic and defense responses.* Oncogene, 26, 917-933.

Chai,J. and Tarnawski,A.S. (2002) *Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing.* J. Physiol Pharmacol., 53, 147-157.

Chen-Goodspeed,M. and Lee,C.C. (2007) *Tumor suppression and circadian function.* J. Biol. Rhythms , 22, 291-298.

Chen,Z., Gibson,T.B., Robinson,F., Silvestro,L., Pearson,G., Xu,B., Wright,A., Vanderbilt,C. and Cobb,M.H. (2001) *MAP kinases.* Chem. Rev., 101, 2449-2476.

Chiang,S.H., Hwang,J., Legendre,M., Zhang,M., Kimura,A. and Saltiel,A.R. (2003) *TCGAP, a multidomain Rho GTPase-activating protein involved in insulin-stimulated glucose transport.* EMBO J., 22, 2679-2691.

Chinenov,Y. and Kerppola,T.K. (2001) *Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity.* Oncogene, 20, 2438-2452.

Cho,Y.J., Cunnick,J.M., Yi,S.J., Kaartinen,V., Groffen,J. and Heisterkamp,N. (2007) *Abr and Bcr, two homologous Rac GTPase-activating proteins, control multiple cellular functions of murine macrophages.* Mol. Cell Biol., 27, 899-911.

Chu,L.W., Zhu,Y., Yu,K., Zheng,T., Yu,H., Zhang,Y., Sesterhenn,I., Chokkalingam,A.P., Danforth,K.N., Shen,M.C., Stanczyk,F.Z., Gao,Y.T. and Hsing,A.W. (2008) *Variants in circadian genes and prostate cancer risk: a population-based study in China.* Prostate Cancer Prostatic. Dis., 11, 342-348.

Cochran,B.H. (1993) *Regulation of immediate early gene expression.* NIDA Res. Monogr, 125, 3-24.

Cohen,D.R. and Curran,T. (1988) *fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen.* Mol. Cell Biol., 8, 2063-2069.

Colicelli,J. (2004) *Human RAS superfamily proteins and related GTPases.* Sci. STKE., 2004, RE13.

Cooper,S.J., Trinklein,N.D., Nguyen,L. and Myers,R.M. (2007) *Serum response factor binding sites differ in three human cell types.* Genome Res., 17, 136-144.

Counter,C.M., Hahn,W.C., Wei,W., Caddle,S.D., Beijersbergen,R.L., Lansdorp,P.M., Sedivy,J.M. and Weinberg,R.A. (1998) *Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 95, 14723-14728.

Criqui-Filipe,P., Ducret,C., Maira,S.M. and Wasylyk,B. (1999) *Net, a negative Ras-switchable TCF, contains a second inhibition domain, the CID, that mediates repression through interactions with CtBP and deacetylation.* EMBO J., 18, 3392-3403.

Debinski,W., Slagle-Webb,B., Achen,M.G., Stacker,S.A., Tulchinsky,E., Gillespie,G.Y. and Gibo,D.M. (2001) *VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme.* Mol. Med., 7, 598-608.

Dimitri,C.A., Dowdle,W., MacKeigan,J.P., Blenis,J. and Murphy,L.O. (2005) *Spatially separate docking sites on ERK2 regulate distinct signaling events in vivo.* Curr. Biol., 15, 1319-1324.

Dioum,E.M., Rutter,J., Tuckerman,J.R., Gonzalez,G., Gilles-Gonzalez,M.A. and McKnight,S.L. (2002) *NPAS2: a gas-responsive transcription factor.* Science, 298, 2385-2387.

- Ducret,C., Maira,S.M., Lutz,Y. and Wasyluk,B. (2000) *The ternary complex factor Net contains two distinct elements that mediate different responses to MAP kinase signalling cascades.* Oncogene, 19, 5063-5072.
- Duncia,J.V., Santella,J.B., III, Higley,C.A., Pitts,W.J., Wityak,J., Frietze,W.E., Rankin,F.W., Sun,J.H., Earl,R.A., Tabaka,A.C., Teleha,C.A., Blom,K.F., Favata,M.F., Manos,E.J., Daulerio,A.J., Stradley,D.A., Horiuchi,K., Copeland,R.A., Scherle,P.A., Trzaskos,J.M., Magolda,R.L., Trainor,G.L., Wexler,R.R., Hobbs,F.W. and Olson,R.E. (1998) *MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 8, 2839-2844.
- Durzynski,L., Gaudin,J.C., Myga,M., Szydlowski,J., Gozdicka-Jozefiak,A. and Haertle,T. (2005) *Olfactory-like receptor cDNAs are present in human lingual cDNA libraries.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 333, 264-272.
- Ebisuya,M., Kondoh,K. and Nishida,E. (2005) *The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity.* J. Cell Sci., 118, 2997-3002.
- Eferl,R. and Wagner,E.F. (2003) *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.* Nat. Rev. Cancer., 3, 859-868.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K. and Tuschl,T. (2001) *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.* Nature, 411, 494-498.
- Englund,A., Kovanen,L., Saarikoski,S.T., Haukka,J., Reunanen,A., Aromaa,A., Lonnqvist,J. and Partonen,T. (2009) *NPAS2 and PER2 are linked to risk factors of the metabolic syndrome.* J. Circadian. Rhythms, 7, 5.
- English,J.M. and Cobb,M.H. (2002) *Pharmacological inhibitors of MAPK pathways.* Trends Pharmacol. Sci., 23, 40-45.
- Ericson,K., Gan,C., Cheong,I., Rago,C., Samuels,Y., Velculescu,V.E., Kinzler,K.W., Huso,D.L., Vogelstein,B. and Papadopoulos,N. (2010) *Genetic inactivation of AKT1, AKT2, and PDPK1 in human colorectal cancer cells clarifies their roles in tumor growth regulation.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 107, 2598-2603.
- Eychene,A., Rocques,N. and Pouponnot,C. (2008) *A new MAFia in cancer.* Nat. Rev. Cancer.
- Favata,M.F., Horiuchi,K.Y., Manos,E.J., Daulerio,A.J., Stradley,D.A., Feeser,W.S., Van Dyk,D.E., Pitts,W.J., Earl,R.A., Hobbs,F., Copeland,R.A., Magolda,R.L., Scherle,P.A. and Trzaskos,J.M. (1998) *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.* J. Biol. Chem., 273, 18623-18632.

Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E. and Mello,C.C. (1998) *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [see comments]*. *Nature*, 391, 806-811.

Fisher,K.E., Sacharidou,A., Stratman,A.N., Mayo,A.M., Fisher,S.B., Mahan,R.D., Davis,M.J. and Davis,G.E. (2009) *MT1-MMP- and Cdc42-dependent signaling co-regulate cell invasion and tunnel formation in 3D collagen matrices*. *J. Cell Sci.*, 122, 4558-4569.

Frasor,J., Chang,E.C., Komm,B., Lin,C.Y., Vega,V.B., Liu,E.T., Miller,L.D., Smeds,J., Bergh,J. and Katzenellenbogen,B.S. (2006) *Gene expression preferentially regulated by tamoxifen in breast cancer cells and correlations with clinical outcome*. *Cancer Res.*, 66, 7334-7340.

Friend,C., Scher,W., Holland,J.G. and Sato,T. (1971) *Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 68, 378-382.

Fu,L., Pelicano,H., Liu,J., Huang,P. and Lee,C. (2002) *The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo*. *Cell*, 111, 41-50.

Gallo,A., Cuozzo,C., Esposito,I., Maggiolini,M., Bonofiglio,D., Vivacqua,A., Garramone,M., Weiss,C., Bohmann,D. and Musti,A.M. (2002) *Menin uncouples Elk-1, JunD and c-Jun phosphorylation from MAP kinase activation*. *Oncogene*, 21, 6434-6445.

Gandemer,V., Rio,A.G., de,T.M., Sibut,V., Mottier,S., Ly,S.B., Henry,C., Monnier,A., Berthou,C., Le,G.E., Le,T.A., Schmitt,C., Le Gall,J.Y., Mosser,J. and Galibert,M.D. (2007) *Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia*. *BMC. Genomics*, 8, 385.

Garrington,T.P. and Johnson,G.L. (1999) *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11, 211-218.

Gentleman,R., Carey,V., Bates,D., Bolstad,B., Dettling,M., udait,S., Iis,B., autier,L., Ge,Y., Gentry,J. and et al. (2004) *Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics*. pp. R80.

Giannini,G., Kim,C.J., di,M.L., Manfioletti,G., Cardinali,B., Cerignoli,F., Ristori,E., Zani,M., Frati,L., Screpanti,I. and Guilino,A. (2000) *Expression of the HMGI(Y) gene products in human neuroblastic tumours correlates with differentiation status*. *Br. J. Cancer*, 83, 1503-1509.

Gil,J., Bernard,D. and Peters,G. (2005) *Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer.* DNA Cell Biol., 24, 117-125.

Gilchrist,M., Thorsson,V., Li,B., Rust,A.G., Korb,M., Kennedy,K., Hai,T., Bolouri,H. and Aderem,A. (2006) *Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4.* Nature, 441, 173-178.

Giovane,A., Pintzas,A., Maira,S.M., Sobieszczuk,P. and Wasylyk,B. (1994) *Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras.* Genes Dev., 8, 1502-1513.

Giovane,A., Sobieszczuk,P., Mignon,C., Mattei,M.G. and Wasylyk,B. (1995) *Locations of the ets subfamily members net, elk1, and sap1 (ELK3, ELK1, and ELK4) on three homologous regions of the mouse and human genomes.* Genomics, 29, 769-772.

Giovane,A., Sobieszczuk,P., Ayadi,A., Maira,S.M. and Wasylyk,B. (1997) *Net-b, a Ras-insensitive factor that forms ternary complexes with serum response factor on the serum response element of the fos promoter.* Mol. Cell Biol., 17, 5667-5678.

Gould,M.C. and Stephano,J.L. (1999) *MAP kinase, meiosis, and sperm centrosome suppression in Urechis caupo.* Dev. Biol., 216, 348-358.

Gross,C., Buchwalter,G., Dubois-Pot,H., Cler,E., Zheng,H. and Wasylyk,B. (2007) *The ternary complex factor net is downregulated by hypoxia and regulates hypoxia-responsive genes.* Mol. Cell Biol., 27, 4133-4141.

Grosskreutz,Y., Hermann,A., Kins,S., Fuhrmann,J.C., Betz,H. and Kneussel,M. (2001) *Identification of a gephyrin-binding motif in the GDP/GTP exchange factor collybistin.* Biol. Chem., 382, 1455-1462.

Gunja,S., Koch,S., May,M., Dietel,M. and Erbersdobler,A. (2009) *Expression of prostatic acid phosphatase (PSAP) in transurethral resection specimens of the prostate is predictive of histopathologic tumor stage in subsequent radical prostatectomies.* Virchows Arch., 454, 573-579.

Hahn,W.C., Counter,C.M., Lundberg,A.S., Beijersbergen,R.L., Brooks,M.W. and Weinberg,R.A. (1999) *Creation of human tumour cells with defined genetic elements.* Nature, 400, 464-468.

Hahn,W.C., Dessain,S.K., Brooks,M.W., King,J.E., Elenbaas,B., Sabatini,D.M., DeCaprio,J.A. and Weinberg,R.A. (2002) *Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation.* Mol. Cell Biol., 22, 2111-2123.

-
- Hamdi,M., Popeijus,H.E., Carlotti,F., Janssen,J.M., van der,B.C., Cornelissen-Steijger,P., van de,W.B., Hoeben,R.C., Matsuo,K. and van,D.H. (2008) *ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses*. DNA Repair (Amst), 7, 487-496.
- Hamra,F.K., Schultz,N., Chapman,K.M., Grellhesl,D.M., Cronkhite,J.T., Hammer,R.E. and Garbers,D.L. (2004) *Defining the spermatogonial stem cell*. Dev. Biol., 269, 393-410.
- Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000) *The hallmarks of cancer*. Cell, 100, 57-70.
- Hanlon,M., Sturgill,T.W. and Sealy,L. (2001) *ERK2- and p90Rsk2-dependent Pathways Regulate the CCAAT/Enhancer-binding Protein- Interaction with Serum Response Factor*. J. Biol. Chem., 276, 38449-38456.
- Hauge,C. and Frodin,M. (2006) *RSK and MSK in MAP kinase signalling*. J. Cell Sci., 119, 3021-3023.
- Hazzalin,C.A. and Mahadevan,L.C. (2002) *MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3, 30-40.
- Hill,C.S. and Treisman,R. (1995) *Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity*. Cell., 80, 199-211.
- Hofer,M.D., Kuefer,R., Varambally,S., Li,H., Ma,J., Shapiro,G.I., Gschwend,J.E., Hautmann,R.E., Sanda,M.G., Giehl,K., Menke,A., Chinnaiyan,A.M. and Rubin,M.A. (2004) *The role of metastasis-associated protein 1 in prostate cancer progression*. Cancer Res., 64, 825-829.
- Hoffman,A.E., Zheng,T., Ba,Y. and Zhu,Y. (2008) *The circadian gene NPAS2, a putative tumor suppressor, is involved in DNA damage response*. Mol. Cancer Res., 6, 1461-1468.
- Hornberg,J.J., Tijssen,M.R. and Lankelma,J. (2004) *Synergistic activation of signalling to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by epidermal growth factor and 4 beta-phorbol 12-myristate 13-acetate*. Eur. J. Biochem., 271, 3905-3913.
- Hota,P.K. and Buck,M. (2009) *Thermodynamic characterization of two homologous protein complexes: associations of the semaphorin receptor plexin-B1 RhoGTPase binding domain with Rnd1 and active Rac1*. Protein Sci., 18, 1060-1071.
- Ihaka,R.G.R. (1996) *R: a language for data analysis and graphics*. pp. 299-314.

Indovina,P. and Giordano,A. (2010) *Targeting the checkpoint kinase WEE1: Selective sensitization of cancer cells to DNA-damaging drugs.* Cancer Biol. Ther., 9.

Ju,S., Zhu,Y., Liu,L., Dai,S., Li,C., Chen,E., He,Y., Zhang,X. and Lu,B. (2009) *Gadd45b and Gadd45g are important for anti-tumor immune responses.* Eur. J. Immunol., 39, 3010-3018.

Juliano,R., Alam,M.R., Dixit,V. and Kang,H. (2008) *Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides.* Nucleic Acids Res., 36, 4158-4171.

Kaneko,K., Yamada,T., Tsukita,S., Takahashi,K., Ishigaki,Y., Oka,Y. and Katagiri,H. (2009) *Obesity alters circadian expressions of molecular clock genes in the brainstem.* Brain Res., 1263, 58-68.

Karnoub,A.E. and Weinberg,R.A. (2008) *Ras oncogenes: split personalities.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 9, 517-531.

Kasza,A., O'Donnell,A., Gascoigne,K., Zeef,L.A., Hayes,A. and Sharrocks,A.D. (2005) *The ETS domain transcription factor Elk-1 regulates the expression of its partner protein, SRF.* J. Biol. Chem., 280, 1149-1155.

Katz,M.E. and McCormick,F. (1997) *Signal transduction from multiple Ras effectors.* Curr. Opin. Genet. Dev., 7, 75-79.

Kenny,P.A., Enver,T. and Ashworth,A. (2005) *Receptor and secreted targets of Wnt-1/beta-catenin signalling in mouse mammary epithelial cells.* BMC. Cancer, 5, 3.

Kim,J.H., Lee,S.C., Ro,J., Kang,H.S., Kim,H.S. and Yoon,S. (2010) *Jnk signaling pathway-mediated regulation of Stat3 activation is linked to the development of doxorubicin resistance in cancer cell lines.* Biochem. Pharmacol., 79, 373-380.

Kondratov,R.V., Kondratova,A.A., Lee,C., Gorbacheva,V.Y., Chernov,M.V. and Antoch,M.P. (2006) *Post-translational regulation of circadian transcriptional CLOCK(NPAS2)/BMAL1 complex by CRYPTOCHROMES.* Cell Cycle, 5, 890-895.

Krauss,G. (2001) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.*

Kuramoto,K., Negishi,M. and Katoh,H. (2009) *Regulation of dendrite growth by the Cdc42 activator Zizimin1/Dock9 in hippocampal neurons.* J. Neurosci. Res., 87, 1794-1805.

Kustikova,O., Kramerov,D., Grigorian,M., Berezin,V., Bock,E., Lukanidin,E. and Tulchinsky,E. (1998) *Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells.* Mol. Cell Biol., 18, 7095-7105.

Kwok,S., Partridge,N.C., Srinivasan,N., Nair,S.V. and Selvamurugan,N. (2009) *Mitogen activated protein kinase-dependent inhibition of osteocalcin gene expression by transforming growth factor-beta1.* J. Cell Biochem., 106, 161-169.

Lee,H.J., Kim,S.Y., Koh,J.M., Bok,J., Kim,K.J., Kim,K.S., Park,M.H., Shin,H.D., Park,B.L., Kim,T.H., Hong,J.M., Park,E.K., Kim,D.J., Oh,B., Kimm,K., Kim,G.S. and Lee,J.Y. (2007) *Polymorphisms and haplotypes of integrin alpha1 (ITGA1) are associated with bone mineral density and fracture risk in postmenopausal Koreans.* Bone, 41, 979-986.

Li,M.D., Mangold,J.E., Seneviratne,C., Chen,G.B., Ma,J.Z., Lou,X.Y. and Payne,T.J. (2009) *Association and interaction analyses of GABBR1 and GABBR2 with nicotine dependence in European- and African-American populations.* PLoS. One., 4, e7055.

Liang,G., Wolfgang,C.D., Chen,B.P., Chen,T.H. and Hai,T. (1996) *ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation.* J. Biol. Chem., 271, 1695-1701.

Lin,M., Morrison,C.D., Jones,S., Mohamed,N., Bacher,J. and Plass,C. (2009) *Copy number gain and oncogenic activity of YWHAZ/14-3-3zeta in head and neck squamous cell carcinoma.* Int. J. Cancer, 125, 603-611.

Liu,T., Lu,B., Lee,I., Ondrovicova,G., Kutejova,E. and Suzuki,C.K. (2004) *DNA and RNA binding by the mitochondrial lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate.* J. Biol. Chem., 279, 13902-13910.

Lund,P., Weisshaupt,K., Mikeska,T., Jammal,D., Chen,X., Kuban,R.J., Ungethüm,U., Krapfenbauer,U., Herzel,H.P., Schafer,R., Walter,J. and Sers,C. (2006) *Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation.* Oncogene, 25, 4890-4903.

Luo,J., Feng,J., Lu,J., Wang,Y., Tang,X., Xie,F. and Li,W. (2009) *Aberrant methylation profile of 14-3-3 sigma and its reduced transcription/expression levels in Chinese sporadic female breast carcinogenesis.* Med. Oncol.,

Lyons,P.J., Muise,A.M. and Ro,H.S. (2005) *MAPK modulates the DNA binding of adipocyte enhancer-binding protein 1.* Biochemistry, 44, 926-931.

Lyons,P.J., Mattatall,N.R. and Ro,H.S. (2006) *Modeling and functional analysis of AEBP1, a transcriptional repressor*. Proteins, 63, 1069-1083.

Maira,S.M., Wurtz,J.M. and Wasylyk,B. (1996) *Net (ERP/SAP2) one of the Ras-inducible TCFs, has a novel inhibitory domain with resemblance to the helix-loop-helix motif*. EMBO J., 15, 5849-5865.

Majdalawieh,A., Zhang,L., Fuki,I.V., Rader,D.J. and Ro,H.S. (2006) *Adipocyte enhancer-binding protein 1 is a potential novel atherogenic factor involved in macrophage cholesterol homeostasis and inflammation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 103, 2346-2351.

Mangone,F.R., Brentani,M.M., Nonogaki,S., Begnami,M.D., Campos,A.H., Walder,F., Carvalho,M.B., Soares,F.A., Torloni,H., Kowalski,L.P. and Federico,M.H. (2005) *Overexpression of Fos-related antigen-1 in head and neck squamous cell carcinoma*. Int. J. Exp. Pathol., 86, 205-212.

Manke,T., Bringas,R. and Vingron,M. (2003) *Correlating protein-DNA and protein-protein interaction networks*. J. Mol. Biol., 333, 75-85.

Manke,T., Roider,H.G. and Vingron,M. (2008) *Statistical modeling of transcription factor binding affinities predicts regulatory interactions*. PLoS. Comput. Biol., 4, e1000039.

Matranga,C. and Zamore,P.D. (2007) *Small silencing RNAs*. Curr. Biol., 17, R789-R793.

Matta,A., Desouza,L.V., Shukla,N.K., Gupta,S.D., Ralhan,R. and Siu,K.W. (2008) *Prognostic significance of head-and-neck cancer biomarkers previously discovered and identified using iTRAQ-labeling and multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Proteome. Res., 7, 2078-2087.

Maynard,M.A., Evans,A.J., Shi,W., Kim,W.Y., Liu,F.F. and Ohh,M. (2007) *Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression*. Cell Cycle, 6, 2810-2816.

Mechta,F., Lallemand,D., Pfarr,C.M. and Yaniv,M. (1997) *Transformation by ras modifies AP1 composition and activity*. Oncogene, 14, 837-847.

Melchjorsen,J., Kristiansen,H., Christiansen,R., Rintahaka,J., Matikainen,S., Paludan,S.R. and Hartmann,R. (2009) *Differential Regulation of the OASL and OAS1 Genes in Response to Viral Infections*. J. Interferon Cytokine Res..

-
- Miano,J.M.** (2003) *Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression*. J. Mol. Cell Cardiol., 35, 577-593.
- Milde-Langosch,K.** (2005) *The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis*. Eur. J. Cancer, 41, 2449-2461.
- Minden,A. and Karin,M.** (1997) *Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases*. Biochim. Biophys. Acta, 1333, F85-104.
- Mitin,N., Konieczny,S.F. and Taparowsky,E.J.** (2006) *RAS and the RAIN/RasIP1 effector*. Methods Enzymol., 407, 322-335.
- Miyamoto,Y., Yamauchi,J., Sanbe,A. and Tanoue,A.** (2007) *Dock6, a Dock-C subfamily guanine nucleotide exchanger, has the dual specificity for Rac1 and Cdc42 and regulates neurite outgrowth*. Exp. Cell Res., 313, 791-804.
- Moussa,O., Turner,D.P., Feldman,R.J., Sementchenko,V.I., McCarragher,B.D., Desouki,M.M., Fraig,M. and Watson,D.K.** (2009) *PDEF is a negative regulator of colon cancer cell growth and migration*. J. Cell Biochem., 108, 1389-1398.
- Muise,A.M. and Ro,H.S.** (1999) *Enzymic characterization of a novel member of the regulatory B-like carboxypeptidase with transcriptional repression function: stimulation of enzymic activity by its target DNA*. Biochem. J., 343 Pt 2, 341-345.
- Murphy,L.O. and Blenis,J.** (2006) *MAPK signal specificity: the right place at the right time*. Trends Biochem. Sci., 31, 268-275.
- Niida,A., Smith,A.D., Imoto,S., Aburatani,H., Zhang,M.Q. and Akiyama,T.** (2009) *Gene set-based module discovery in the breast cancer transcriptome*. BMC. Bioinformatics., 10, 71.
- Nishimoto,S. and Nishida,E.** (2006) *MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2*. EMBO Rep., 7, 782-786.
- Niu,Z., Yu,W., Zhang,S.X., Barron,M., Belaguli,N.S., Schneider,M.D., Parmacek,M., Nordheim,A. and Schwartz,R.J.** (2005) *Conditional mutagenesis of the murine serum response factor gene blocks cardiogenesis and the transcription of downstream gene targets*. J. Biol. Chem., 280, 32531-32538.

Obsil,T., Ghirlando,R., Anderson,D.E., Hickman,A.B. and Dyda,F. (2003) *Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding.* Biochemistry, 42, 15264-15272.

Oikawa,T. and Yamada,T. (2003) *Molecular biology of the Ets family of transcription factors.* Gene, 303:11-34, 11-34.

Oksvold,M.P., Huitfeldt,H.S. and Langdon,W.Y. (2004) *Identification of 14-3-3zeta as an EGF receptor interacting protein.* FEBS Lett., 569, 207-210.

Osawa,M., Itoh,S., Ohta,S., Huang,Q., Berk,B.C., Marmarosh,N.L., Che,W., Ding,B., Yan,C. and Abe,J. (2004) *ERK1/2 associates with the c-Met-binding domain of growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)-associated binder-1 (Gab1): role in ERK1/2 and early growth response factor-1 (Egr-1) nuclear accumulation.* J. Biol. Chem., 279, 29691-29699.

Ozanne,B.W., Spence,H.J., McGarry,L.C. and Hennigan,R.F. (2007) *Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals.* Oncogene, 26, 1-10.

Palmiter,R.D. (2009) *Reduced levels of neurotransmitter-degrading enzyme PRCP promote a lean phenotype. [corrected].* J. Clin. Invest, 119, 2130-2133.

Parlakian,A., Charvet,C., Escoubet,B., Mericskay,M., Molkentin,J.D., Gary-Bobo,G., De Windt,L.J., Ludosky,M.A., Paulin,D., Daegelen,D., Tuil,D. and Li,Z. (2005) *Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart.* Circulation, 112, 2930-2939.

Paumelle,R., Tulasne,D., Leroy,C., Coll,J., Vandenbunder,B. and Fafeur,V. (2000) *Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in madin-darby canine kidney epithelial cells.* Mol. Biol. Cell, 11, 3751-3763.

Pendaries,V., Gasc,G., Titeux,M., Leroux,C., Vitezica,Z.G., Mejia,J.E., Decha,A., Loiseau,P., Bodemer,C., Prost-Squarcioni,C. and Hovnanian,A. (2010) *Immune reactivity to type VII collagen: implications for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa.* Gene Ther., 17, 930-937.

Persengiev,S.P., Zhu,X. and Green,M.R. (2004) *Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs).* RNA., 10, 12-18.

Piette,J. and Yaniv,M. (1987) *Two different factors bind to the alpha-domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and c-fos enhancers.* EMBO J., 6, 1331-1337.

Pincetic,A., Kuang,Z., Seo,E.J. and Leis,J. (2010) *The interferon-induced gene ISG15 blocks retrovirus release from cells late in the budding process.* J. Virol., 84, 4725-4736.

Pine,S.R., Wiemels,J.L., Jayabose,S. and Sandoval,C. (2003) *TEL-AML1 fusion precedes differentiation to pre-B cells in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Leuk. Res., 27, 155-164.

Pollock,C.B., Shirasawa,S., Sasazuki,T., Kolch,W. and Dhillon,A.S. (2005) *Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells.* Cancer Res., 65, 1244-1250.

Poole,E., Groves,I., MacDonald,A., Pang,Y., Alcamì,A. and Sinclair,J. (2009) *Identification of TRIM23 as a cofactor involved in the regulation of NF-kappaB by human cytomegalovirus.* J. Virol., 83, 3581-3590.

Posern,G. and Treisman,R. (2006) *Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction.* Trends Cell Biol., 16, 588-596.

Powell,D.W., Rane,M.J., Joughin,B.A., Kalmukova,R., Hong,J.H., Tidor,B., Dean,W.L., Pierce,W.M., Klein,J.B., Yaffe,M.B. and McLeish,K.R. (2003) *Proteomic identification of 14-3-3zeta as a mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 substrate: role in dimer formation and ligand binding.* Mol. Cell Biol., 23, 5376-5387.

Price,M.A., Rogers,A.E. and Treisman,R. (1995) *Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET).* EMBO J., 14, 2589-2601.

Prochownik,E.V. (2008) *c-Myc: linking transformation and genomic instability.* Curr. Mol. Med., 8, 446-458.

Pushparaj,P.N., Aarthi,J.J., Manikandan,J. and Kumar,S.D. (2008) *siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo applications.* J. Dent. Res., 87, 992-1003.

Qin,H., Chan,M.W., Liyanarachchi,S., Balch,C., Potter,D., Souriraj,I.J., Cheng,A.S., gosto-Perez,F.J., Nikonova,E.V., Yan,P.S., Lin,H.J., Nephew,K.P., Saltz,J.H., Showe,L.C., Huang,T.H. and Davuluri,R.V. (2009) *An integrative ChIP-chip and gene expression profiling to model SMAD regulatory modules.* BMC. Syst. Biol., 3, 73.

- Rahman,M., Davis,S.R., Pumphrey,J.G., Bao,J., Nau,M.M., Meltzer,P.S. and Lipkowitz,S.** (2009) *TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a mesenchymal phenotype*. *Breast Cancer Res. Treat.*, 113, 217-230.
- Rajaram,N. and Kerppola,T.K.** (1997) *DNA bending by Fos-Jun and the orientation of heterodimer binding depend on the sequence of the AP-1 site*. *EMBO J.*, 16, 2917-2925.
- Reddy,S.P. and Mossman,B.T.** (2002) *Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung*. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol*, 283, L1161-L1178.
- Reick,M., Garcia,J.A., Dudley,C. and McKnight,S.L.** (2001) *NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain*. *Science*, 293, 506-509.
- Reznik,S.E. and Fricker,L.D.** (2001) *Carboxypeptidases from A to z: implications in embryonic development and Wnt binding*. *Cell Mol. Life Sci.*, 58, 1790-1804.
- Rivera,V.M., Miranti,C.K., Misra,R.P., Ginty,D.D., Chen,R.H., Blenis,J. and Greenberg,M.E.** (1993) *A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity*. *Mol. Cell Biol.*, 13, 6260-6273.
- Ro,H.S., Zhang,L., Majdalawieh,A., Kim,S.W., Wu,X., Lyons,P.J., Webber,C., Ma,H., Reidy,S.P., Boudreau,A., Miller,J.R., Mitchell,P. and McLeod,R.S.** (2007) *Adipocyte enhancer-binding protein 1 modulates adiposity and energy homeostasis*. *Obesity*. (Silver. Spring), 15, 288-302.
- Robinson,M.J. and Cobb,M.H.** (1997) *Mitogen-activated protein kinase pathways*. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 180-186.
- Rodriguez,C.I., Girones,N. and Fresno,M.** (2003) *Cha, a basic helix-loop-helix transcription factor involved in the regulation of upstream stimulatory factor activity*. *J. Biol. Chem.*, 278, 43135-43145.
- Roux,P.P. and Blenis,J.** (2004) *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, 320-344.
- Rutter,J., Reick,M., Wu,L.C. and McKnight,S.L.** (2001) *Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors*. *Science*, 293, 510-514.

Sabharwal,R., Zhang,Z., Lu,Y., Abboud,F.M., Russo,A.F. and Chapleau,M.W. (2010) *Receptor activity-modifying protein 1 increases baroreflex sensitivity and attenuates Angiotensin-induced hypertension.* Hypertension, 55, 627-635.

Sahai,E. and Marshall,C.J. (2002) *RHO-GTPases and cancer.* Nat. Rev. Cancer, 2, 133-142.

Sakurai,K., Michiue,T., Kikuchi,A. and Asashima,M. (2004) *Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway in cytoplasm: a novel property of the carboxyl terminal domains of two Xenopus ELL genes.* Zoolog. Sci., 21, 407-416.

Schaeper,U., Boyd,J.M., Verma,S., Uhlmann,E., Subramanian,T. and Chinnadurai,G. (1995) *Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 92, 10467-10471.

Scharer,C.D., McCabe,C.D., li-Seyed,M., Berger,M.F., Bulyk,M.L. and Moreno,C.S. (2009) *Genome-wide promoter analysis of the SOX4 transcriptional network in prostate cancer cells.* Cancer Res., 69, 709-717.

Selvaraj,A. and Prywes,R. (2004) *Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent.* BMC. Mol. Biol., 5, 13.

Serrano,M., Lin,A.W., McCurrach,M.E., Beach,D. and Lowe,S.W. (1997) *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.* Cell, 88, 593-602.

Seth,A. and Watson,D.K. (2005) *ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer.* Eur. J. Cancer, 41, 2462-2478.

Sharrocks,A.D. (2002) *Complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily.* The Colworth Medal Lecture. Biochem. Soc. Trans., 30, 1-9.

Siep,M., Sleddens-Linkels,E., Mulders,S., van,E.H., Wassenaar,E., Van Cappellen,W.A., Hoogerbrugge,J., Grootegoed,J.A. and Baarends,W.M. (2004) *Basic helix-loop-helix transcription factor Tcf15 interacts with the Calmegin gene promoter in mouse spermatogenesis.* Nucleic Acids Res., 32, 6425-6436.

Spencer,J.A. and Misra,R.P. (1999) *Expression of the SRF gene occurs through a Ras/Sp/SRF-mediated-mechanism in response to serum growth signals.* Oncogene, 18, 7319-7327.

Stewart,N. and Bacchetti,S. (1991) *Expression of SV40 large T antigen, but not small t antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells.* Virology, 180, 49-57.

Stindl,R. (2002) *Cancer: How many genes does it take?* http://www.stindl.info/pdfs/my_unpublished_letter_to_Cancer_Research.pdf

Stratton,M.R., Campbell,P.J. and Futreal,P.A. (2009) *The cancer genome.* Nature, 458, 719-724.

Stuart,E.T. and Gruss,P. (1996) *PAX: developmental control genes in cell growth and differentiation.* Cell Growth Differ., 7, 405-412.

Subramanian,A., Tamayo,P., Mootha,V.K., Mukherjee,S., Ebert,B.L., Gillette,M.A., Paulovich,A., Pomeroy,S.L., Golub,T.R., Lander,E.S. and Mesirov,J.P. (2005) *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 102, 15545-15550.

Sumoy,L., Carim,L., Escarceller,M., Nadal,M., Gratacos,M., Pujana,M.A., Estivill,X. and Peral,B. (2000) *HMG20A and HMG20B map to human chromosomes 15q24 and 19p13.3 and constitute a distinct class of HMG-box genes with ubiquitous expression.* Cytogenet. Cell Genet., 88, 62-67.

Sun,Q., Chen,G., Streb,J.W., Long,X., Yang,Y., Stoeckert,C.J., Jr. and Miano,J.M. (2006) *Defining the mammalian CArGome.* Genome Res., 16, 197-207.

Tadokoro,K., Hashimoto,R., Tatsumi,M., Kosuga,A., Kamijima,K. and Kunugi,H. (2005) *The Gem interacting protein (GMIP) gene is associated with major depressive disorder.* Neurogenetics., 6, 127-133.

Talotta,F., Cimmino,A., Matarazzo,M.R., Casalino,L., De,V.G., D'Esposito,M., Di,L.R. and Verde,P. (2009) *An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation.* Oncogene, 28, 73-84.

Tanaka,M., Levy,J., Terada,M., Breslow,R., Rifkind,R.A. and Marks,P.A. (1975) *Induction of erythroid differentiation in murine virus infected eythroleukemia cells by highly polar compounds.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 72, 1003-1006.

Taneja,T.K., Mankouri,J., Karnik,R., Kannan,S., Smith,A.J., Munsey,T., Christesen,H.B., Beech,D.J. and Sivaprasadarao,A. (2009) *Sar1-GTPase-dependent ER exit of KATP channels revealed by a mutation causing congenital hyperinsulinism.* Hum. Mol. Genet., 18, 2400-2413.

Tanoue,T. and Nishida,E. (2003) *Molecular recognitions in the MAP kinase cascades.* Cell Signal., 15, 455-462.

Tchernitsa,O.I., Sers,C., Zuber,J., Hinzmann,B., Grips,M., Schramme,A., Lund,P., Schwendel,A., Rosenthal,A. and Schafer,R. (2004) *Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells.* Oncogene, 23, 4536-4555.

Tee,A.R., Anjum,R. and Blenis,J. (2003) *Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin.* J. Biol. Chem., 278, 37288-37296.

Thines,B. and Harmon,F.G. (2010) *Ambient temperature response establishes ELF3 as a required component of the core Arabidopsis circadian clock.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 107, 3257-3262.

Thuault,S., Valcourt,U., Petersen,M., Manfioletti,G., Heldin,C.H. and Moustakas,A. (2006) *Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition.* J. Cell Biol., 174, 175-183.

Toh,Y., Pencil,S.D. and Nicolson,G.L. (1994) *A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses.* J. Biol. Chem., 269, 22958-22963.

Tomaru,Y., Nakanishi,M., Miura,H., Kimura,Y., Ohkawa,H., Ohta,Y., Hayashizaki,Y. and Suzuki,M. (2009) *Identification of an inter-transcription factor regulatory network in human hepatoma cells by Matrix RNAi.* Nucleic Acids Res., 37, 1049-1060.

Tukey,J.W. (1977) *Exploratory data analysis.* Addison-Wesley Pub. Co, Reading, Mass.

Tuschl,T. (2001) *RNA interference and small interfering RNAs.* Chembiochem., 2, 239-245.

Vallone,D., Battista,S., Pierantoni,G.M., Fedele,M., Casalino,L., Santoro,M., Viglietto,G., Fusco,A. and Verde,P. (1997) *Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product.* EMBO J., 16, 5310-5321.

van,R.J., Buchwalter,G., Soto,U., De-Castro,A.J., Hausen,H.Z., Wasyluk,B. and Rosl,F. (2005) *Loss of net as repressor leads to constitutive increased c-fos transcription in cervical cancer cells.* J. Biol. Chem., 280, 3286-3294.

Verde,P., Casalino,L., Talotta,F., Yaniv,M. and Weitzman,J.B. (2007) *Deciphering AP-1 function in tumorigenesis: fra-ternizing on target promoters.* Cell Cycle, 6, 2633-2639.

Vial,E. and Marshall,C.J. (2003) *Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells.* J. Cell Sci., 116, 4957-4963.

Villacorta,L., Garcia-Barrio,M.T. and Chen,Y.E. (2007) *Transcriptional regulation of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptors.* Curr. Atheroscler. Rep., 9, 230-237.

Visegrady,B. and Machesky,L.M. (2010) *Myopathy-causing actin mutations promote defects in serum-response factor signalling.* Biochem. J., 427, 41-48.

Vogelstein,B. and Kinzler,K.W. (2004) *Cancer genes and the pathways they control.* Nat. Med., 10, 789-799.

Vogt,P.K. (2001) *Jun, the oncoprotein.* Oncogene, 20, 2365-2377.

Wagner,E.F. and Eferl,R. (2005) *Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system.* Immunol. Rev., 208, 126-140.

Wang,C.F., Yuan,C.Z., Wang,S.H., Zhang,H., Hu,X.X., Zhang,L., Wu,C. and Li,N. (2007) *Differential gene expression of aldolase C (ALDOC) and hypoxic adaptation in chickens.* Anim Genet., 38, 203-210.

Wang,K., Saito,M., Bisikirska,B.C., Alvarez,M.J., Lim,W.K., Rajbhandari,P., Shen,Q., Nemenman,I., Basso,K., Margolin,A.A., Klein,U., la-Favera,R. and Califano,A. (2009) *Genome-wide identification of post-translational modulators of transcription factor activity in human B cells.* Nat. Biotechnol., 27, 829-839.

Wang,X. and Tournier,C. (2006) *Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway.* Cell Signal, 18, 753-760.

Wang,Z., Wang,D.Z., Hockemeyer,D., McAnally,J., Nordheim,A. and Olson,E.N. (2004) *Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression.* Nature, 428, 185-189.

Wasylyk,C., Criqui-Filipe,P. and Wasylyk,B. (2005) *Sumoylation of the net inhibitory domain (NID) is stimulated by PIAS1 and has a negative effect on the transcriptional activity of Net.* Oncogene, 24, 820-828.

Weinberg,R.A. (2006) *The Biology of cancer.* Garland Science.

Wilkens,M., Kooi,K.A., van de Vlies,P., Dijkhuizen,T., Suurmeijer,A.J.H., Hofstra,R.M.W., Kok,K., Buys,C.H.C.M. and Gerbens,F. (2010) *Gene expression patterns and copy number changes in primary osteosarcoma.* pp. 81-108.

Wityak,J., Hobbs,F.W., Gardner,D.S., Santella,J.B., III, Petraitis,J.J., Sun,J.H., Favata,M.F., Daulerio,A.J., Horiuchi,K.Y., Copeland,R.A., Scherle,P.A., Jaffe,B.D., Trzaskos,J.M., Magolda,R.L., Trainor,G.L. and Duncia,J.V. (2004) *Beyond U0126. Dianion chemistry leading to the rapid synthesis of a series of potent MEK inhibitors*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 1483-1486.

Wolfman,J.C., Palmby,T., Der,C.J. and Wolfman,A. (2002) *Cellular N-Ras promotes cell survival by downregulation of Jun N-terminal protein kinase and p38*. Mol. Cell Biol., 22, 1589-1606.

Wu,J., Huen,M.S., Lu,L.Y., Ye,L., Dou,Y., Ljungman,M., Chen,J. and Yu,X. (2009) *Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response*. Mol. Cell Biol., 29, 849-860.

Wu,X., Wiater,M.F. and Ritter,S. (2010) *NPAS2 deletion impairs responses to restricted feeding but not to metabolic challenges*. Physiol Behav., 99, 466-471.

Xia,Z., Dickens,M., Raingeaud,J., Davis,R.J. and Greenberg,M.E. (1995) *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. Science, 270, 1326-1331.

Xu,B.E., Stippec,S., Lenertz,L., Lee,B.H., Zhang,W., Lee,Y.K. and Cobb,M.H. (2004) *WNK1 activates ERK5 by an MEKK2/3-dependent mechanism*. J. Biol. Chem., 279, 7826-7831.

Yamaguchi,K., Lee,S.H., Kim,J.S., Wimalasena,J., Kitajima,S. and Baek,S.J. (2006) *Activating transcription factor 3 and early growth response 1 are the novel targets of LY294002 in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway*. Cancer Res., 66, 2376-2384.

Yamamoto,T., Ebisuya,M., Ashida,F., Okamoto,K., Yonehara,S. and Nishida,E. (2006) *Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression*. Curr. Biol., 16, 1171-1182.

Yang,S.H., Sharrocks,A.D. and Whitmarsh,A.J. (2003) *Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades*. Gene, 320, 3-21.

Yi,C.H., Zheng,T., Leaderer,D., Hoffman,A. and Zhu,Y. (2009) *Cancer-related transcriptional targets of the circadian gene NPAS2 identified by genome-wide ChIP-on-chip analysis*. Cancer Lett..

Young,M.R. and Colburn,N.H. (2006) *Fra-1 a target for cancer prevention or intervention*. Gene, 379, 1-11.

-
- Zaromytidou,A.I., Miralles,F. and Treisman,R.** (2006) *MAL and ternary complex factor use different mechanisms to contact a common surface on the serum response factor DNA-binding domain.* Mol. Cell Biol., 26, 4134-4148.
- Zhang,L., Reidy,S.P., Nicholson,T.E., Lee,H.J., Majdalawieh,A., Webber,C., Stewart,B.R., Dolphin,P. and Ro,H.S.** (2005) *The role of AEBP1 in sex-specific diet-induced obesity.* Mol. Med., 11, 39-47.
- Zhang,W., Hart,J., McLeod,H.L. and Wang,H.L.** (2005) *Differential expression of the AP-1 transcription factor family members in human colorectal epithelial and neuroendocrine neoplasms.* Am. J. Clin. Pathol., 124, 11-19.
- Zhu,Y., Leaderer,D., Guss,C., Brown,H.N., Zhang,Y., Boyle,P., Stevens,R.G., Hoffman,A., Qin,Q., Han,X. and Zheng,T.** (2007) *Ala394Thr polymorphism in the clock gene NPAS2: a circadian modifier for the risk of non-Hodgkin's lymphoma.* Int. J. Cancer, 120, 432-435.
- Zhu,Y., Stevens,R.G., Leaderer,D., Hoffman,A., Holford,T., Zhang,Y., Brown,H.N. and Zheng,T.** (2008) *Non-synonymous polymorphisms in the circadian gene NPAS2 and breast cancer risk.* Breast Cancer Res. Treat., 107, 421-425.
- Zimonjic,D., Brooks,M.W., Popescu,N., Weinberg,R.A. and Hahn,W.C.** (2001) *Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability.* Cancer Res., 61, 8838-8844.
- Zippo,A., De,R.A., Serafini,R. and Oliviero,S.** (2007) *PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation.* Nat. Cell Biol., 9, 932-944.
- Zuber,J., Tchernitsa,O.I., Hinzmann,B., Schmitz,A.C., Grips,M., Hellriegel,M., Sers,C., Rosenthal,A. and Schafer,R.** (2000) *A genome-wide survey of RAS transformation targets.* Nature Genet., 24, 144-152.

ii Anhang

Tab. I: durch U0126-Behandlung signifikant regulierte Gene in HA1ER

P-Wert < 0,05, Dargestellt ist sowohl die Expressionsänderung in HA1EB, als auch in HA1ER. ER: HA1ER, EB:HA1EB, U0:U0126, 48- 48h Behandlung, 96:96h Behandlung

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
207071_s_at	ACO1	2,49	0,99	0,65	0,7	0,92
201786_s_at	ADAR	0,27	0,82	2,38	1,06	2,24
205891_at	ADORA2B	2,93	1,2	0,43	0,54	0,8
206170_at	ADRB2	1,88	1,06	0,73	0,69	1,07
212283_at	AGRN	0,7	0,97	1,09	1,08	1,01
219308_s_at	AK5	2,73	0,83	0,44	0,44	1
218487_at	ALAD	1,7	1,02	0,71	0,64	1,11
207016_s_at	ALDH1A2	0,4	0,76	1,24	0,82	1,52
203180_at	ALDH1A3	3,28	0,79	0,27	0,26	1,05
204174_at	ALOX5AP	0,61	0,88	1,01	1,05	0,96
206385_s_at	ANK3	0,56	0,81	0,9	0,72	1,26
202888_s_at	ANPEP	2,05	0,81	0,28	0,3	0,92
203300_x_at	AP1S2	2,25	1,12	0,47	0,58	0,82
209546_s_at	APOL1	0,43	0,85	1,13	0,99	1,14
206298_at	ARHGAP22	2,41	1,12	0,32	0,31	1,02
202548_s_at	ARHGEF7	1,84	1,07	0,83	0,95	0,87
212614_at	ARAFFYID5B	0,38	1,21	3,24	3,23	1
202207_at	ARL7	5,31	0,78	0,21	0,18	1,18
202206_at	ARL7	4,07	0,74	0,3	0,25	1,16
202208_s_at	ARL7	3,37	0,94	0,26	0,22	1,17
218694_at	ARMCX1	2,28	1,27	0,84	0,78	1,08
200950_at	ARPC1A	2,03	0,91	0,68	0,71	0,95
212819_at	ASB1	2,63	1,15	0,75	0,9	0,83
210896_s_at	ASPH	2,88	1,12	0,64	0,65	0,99
207076_s_at	ASS	0,42	0,83	1,17	1,16	1,01
202672_s_at	ATF3	0,27	1,31	2,4	2,2	1,09
214255_at	ATP10A	0,35	0,77	1,99	1,26	1,59
212062_at	ATP9A	1,94	1,37	0,89	1,14	0,78
203188_at	B3GNT6	2,25	0,99	0,59	0,74	0,8
206233_at	B4GALT6	2,94	0,92	0,62	0,62	1
209502_s_at	BAIAP2	0,72	0,88	1,13	1,07	1,06
213318_s_at	BAT3	2,32	1,43	0,73	0,98	0,74
205084_at	BCAP29	1,83	0,88	0,92	0,85	1,08
205681_at	BCL2A1	1,85	0,81	0,43	0,46	0,93
215440_s_at	BEXL1	2,91	1,28	0,56	0,79	0,71
202357_s_at	BF	0,46	0,91	1,04	0,85	1,22
201170_s_at	BHLHB2	0,36	0,62	1,45	1,2	1,21
212702_s_at	BICD2	1,9	1,05	0,91	1,05	0,87
206133_at	BIRC4BP	0,27	0,81	1,25	1,11	1,13
201848_s_at	BNIP3	4,09	1,1	0,63	0,71	0,89
201849_at	BNIP3	5,18	1,25	0,65	0,75	0,87
221478_at	BNIP3L	2,54	1,02	0,73	0,72	1,01
205715_at	BST1	0,49	0,8	1,4	1,16	1,21
201641_at	BST2	0,05	1,32	1,12	0,71	1,56

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
203482_at	C10orf6	1,86	1,02	0,74	0,74	1
212121_at	C10orf61	2,1	1,22	0,84	0,93	0,9
212123_at	C10orf61	1,45	1,08	1,04	1,1	0,94
219563_at	C14orf139	1,9	1,05	0,67	0,85	0,79
212992_at	C14orf78	2,07	1,16	0,69	0,79	0,87
212164_at	C1orf37	1,87	0,97	1,13	1,16	0,97
207571_x_at	C1orf38	0,5	0,92	0,77	0,76	1,02
218914_at	C1orf66	1,61	1,27	0,75	0,9	0,84
218456_at	C1QDC1	2,04	1	0,66	0,64	1,04
212067_s_at	C1R	0,49	0,94	1,2	1,12	1,07
208747_s_at	C1S	0,45	0,94	1,13	1,06	1,06
216421_at	C20orf9	1,58	1,09	1,04	1,03	1,01
212875_s_at	C21orf25	2,77	1,04	0,47	0,46	1,01
218377_s_at	C21orf6	0,62	1,12	1,23	1,08	1,14
221984_s_at	C2orf17	2,06	1,21	0,93	1,02	0,91
201310_s_at	C5orf13	0,47	1,4	3,3	2,69	1,23
220755_s_at	C6orf48	2,21	1,25	0,78	1,07	0,73
219261_at	C7orf26	1,47	1,01	0,84	1	0,84
219060_at	C8orf32	1,64	0,98	0,97	0,93	1,04
218998_at	C9orf6	1,57	0,86	0,98	1	0,98
217873_at	CAB39	1,9	1,13	0,76	0,7	1,09
211985_s_at	CALM1	1,94	0,83	0,67	0,61	1,1
212757_s_at	CAMK2G	1,61	1,19	0,8	0,92	0,87
218309_at	CAMK2N1	3,05	0,83	0,24	0,27	0,88
203538_at	CAMLG	2,27	1,2	0,83	1	0,83
213268_at	CAMTA1	0,43	0,85	1,16	1,05	1,11
208683_at	CAPN2	3,55	1,09	0,67	0,65	1,03
212126_at	CBX5	1,69	1,16	0,87	0,98	0,88
203418_at	CCNA2	0,5	0,85	1,47	1,21	1,21
208712_at	CCND1	8,55	0,94	0,3	0,51	0,59
208796_s_at	CCNG1	2,28	1,13	0,83	0,94	0,88
222156_x_at	CCPG1	2,01	0,92	0,87	0,9	0,98
215856_at	CD33L3	5,07	0,79	0,07	0,09	0,86
210916_s_at	CD44	6,13	0,86	0,37	0,42	0,88
212014_x_at	CD44	6,02	0,83	0,35	0,38	0,93
204490_s_at	CD44	6,63	0,87	0,35	0,4	0,87
209835_x_at	CD44	6,06	0,89	0,34	0,43	0,8
217523_at	CD44	2,49	0,81	0,48	0,44	1,07
204489_s_at	CD44	4,52	0,94	0,41	0,44	0,93
212063_at	CD44	6,2	0,92	0,41	0,34	1,21
200985_s_at	CD59	3,33	1,08	0,56	0,62	0,9
200984_s_at	CD59	2,28	1	0,61	0,77	0,79
209619_at	CD74	0,49	0,81	1,3	0,92	1,42
212899_at	CDC2L6	1,8	1,08	0,7	0,72	0,97
203967_at	CDC6	0,45	0,87	1,25	1,17	1,07
203968_s_at	CDC6	0,45	1,03	1,03	1,15	0,89
218451_at	CDCP1	5,29	1,11	0,29	0,27	1,04
206866_at	CDH4	2,81	1,19	0,44	0,55	0,8

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
204066_s_at	CENTG2	1,89	0,72	0,86	0,84	1,03
218421_at	CERK	2,05	1,03	0,74	0,99	0,75
210563_x_at	CFLAR	0,39	0,92	2,08	1,98	1,05
209939_x_at	CFLAR	0,47	0,98	2,33	2,12	1,1
209666_s_at	CHUK	2,37	0,95	0,99	1,2	0,82
201953_at	CIB1	1,81	1,07	0,66	0,76	0,87
211709_s_at	CLEC11A	2,3	1,3	0,41	0,59	0,69
205131_x_at	CLEC11A	1,72	1,3	0,55	0,71	0,77
209732_at	CLEC2B	2,3	0,89	0,96	0,85	1,13
219529_at	CLIC3	0,36	0,71	1,46	1,28	1,15
205944_s_at	CLTCL1	0,65	1,04	1,31	1,28	1,02
208791_at	CLU	0,68	1,11	0,91	0,99	0,92
212977_at	CMKOR1	0,24	1,21	3,35	2,87	1,17
214841_at	CNIH3	5,16	1,14	0,22	0,24	0,91
203951_at	CNN1	0,19	1,81	6,29	6,2	1,02
203642_s_at	COBLL1	1,73	0,86	0,88	0,8	1,1
37892_at	COL11A1	0,05	0,66	12,37	1,37	9,01
204320_at	COL11A1	0,1	0,7	6,78	1,38	4,9
211343_s_at	COL13A1	5,88	0,76	0,15	0,15	0,99
204345_at	COL16A1	0,43	1,14	1,85	1,46	1,26
202311_s_at	COL1A1	0,12	1,05	6,4	3,5	1,83
202310_s_at	COL1A1	0,09	1,14	4,55	2,91	1,57
202404_s_at	COL1A2	0,03	1,17	68,79	28,02	2,46
202403_s_at	COL1A2	0,1	1,13	16,02	10,06	1,59
211980_at	COL4A1	0,14	0,85	7,76	5,11	1,52
211981_at	COL4A1	0,12	0,64	5,2	3,82	1,36
211966_at	COL4A2	0,28	0,73	2,33	1,94	1,2
213110_s_at	COL4A5	0,44	1,03	1,31	1,24	1,06
221729_at	COL5A2	0,19	1,22	3,51	3,18	1,11
221730_at	COL5A2	0,26	1,08	2,44	2,4	1,02
201438_at	COL6A3	8,79	0,43	0,14	0,15	0,95
221900_at	COL8A2	0,45	0,8	1,24	1,08	1,15
205538_at	CORO2A	1,45	1,17	1	1,02	0,98
209789_at	CORO2B	1,91	0,82	0,38	0,4	0,97
204662_at	CP110	1,56	1,11	1,16	1,2	0,96
201117_s_at	CPE	0,14	0,58	3,27	1,21	2,7
202119_s_at	CPNE3	3,06	0,82	0,49	0,53	0,93
201989_s_at	CREBL2	2,44	1,32	0,63	0,88	0,72
201200_at	CREG1	0,21	0,53	2,95	1	2,95
221541_at	CRISPLD2	0,13	0,68	15,53	6,72	2,31
219913_s_at	CRNKL1	1,53	1,04	0,92	0,94	0,98
215646_s_at	CSPG2	0,23	0,49	3,81	1,51	2,52
204620_s_at	CSPG2	0,25	0,73	4,36	1,98	2,2
207030_s_at	CSRP2	0,41	0,92	2,53	1,94	1,31
201201_at	CSTB	2,31	1,31	0,85	1,09	0,78
201904_s_at	CTDSPL	1,79	1,08	0,64	0,76	0,84
201906_s_at	CTDSPL	2,11	1,12	0,59	0,66	0,88
206085_s_at	CTH	0,31	1	1,15	1,01	1,13

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
217127_at	CTH	0,18	1,07	2,07	1,54	1,34
213274_s_at	CTSB	2,56	1,09	0,69	0,74	0,93
200838_at	CTSB	2,72	0,91	0,62	0,63	0,99
200839_s_at	CTSB	2,85	1,26	0,64	0,64	1
213275_x_at	CTSB	2,95	1,38	0,62	0,61	1,02
210074_at	CTSL2	0,49	0,87	1,59	1,14	1,4
211122_s_at	CXCL11	0,53	0,9	1,01	0,88	1,14
205088_at	CXorf6	1,68	0,93	0,74	0,86	0,86
209163_at	CYB561	0,61	0,84	1,06	1,04	1,02
203763_at	D2LIC	1,74	0,98	0,96	1	0,96
206414_s_at	DDEF2	1,7	1,19	0,78	0,9	0,87
218943_s_at	DDX58	0,08	0,93	2,29	0,76	3,02
219763_at	DENND1A	1,73	0,83	1,09	1,01	1,08
221081_s_at	DENND2D	0,51	0,85	1,29	1,05	1,23
203695_s_at	DFNA5	1,71	1,02	0,9	0,84	1,07
218218_at	DIP13B	1,95	0,84	0,78	0,68	1,15
209015_s_at	DNAJB6	2,93	1,4	0,45	0,79	0,57
212838_at	DNMBP	5,28	1,01	0,2	0,24	0,85
205003_at	DOCK4	26,17	0,96	0,1	0,12	0,87
212538_at	DOCK9	1,92	0,83	0,4	0,46	0,89
215238_s_at	DOCK9	1,43	0,82	0,94	0,88	1,07
219590_x_at	DPH5	1,89	1	1,07	1,04	1,03
212792_at	DPY19L1	2,18	1,22	0,62	0,66	0,94
200762_at	DPYSL2	3,01	1,31	0,45	0,59	0,76
201431_s_at	DPYSL3	2,52	1,23	0,47	0,56	0,84
212254_s_at	DST	1,87	0,78	1,19	0,85	1,4
221563_at	DUSP10	1,71	0,83	1,02	0,96	1,06
204014_at	DUSP4	4,02	1,34	0,3	0,43	0,68
204015_s_at	DUSP4	2,23	1,18	0,36	0,49	0,74
209457_at	DUSP5	3,31	0,82	0,54	0,54	0,99
208892_s_at	DUSP6	7,62	1,13	0,11	0,13	0,82
208891_at	DUSP6	6,11	0,99	0,07	0,09	0,74
208893_s_at	DUSP6	2,67	0,84	0,26	0,27	0,98
213848_at	DUSP7	2,04	0,96	0,88	0,89	0,98
208091_s_at	ECOP	2	1,26	0,84	0,98	0,86
204540_at	EEF1A2	0,55	1,52	1,05	1,46	0,72
201843_s_at	EFEMP1	4,63	1,5	0,29	0,4	0,71
201842_s_at	EFEMP1	4,81	1,93	0,26	0,42	0,62
219833_s_at	EFHC1	2,35	1,06	0,4	0,4	0,99
202023_at	EFNA1	0,53	0,89	1,38	1,25	1,1
212830_at	EGFL5	2,89	0,94	0,65	0,63	1,04
218935_at	EHD3	2,15	0,96	0,34	0,4	0,86
202461_at	EIF2B2	1,7	1,07	1	0,95	1,05
200595_s_at	EIF3S10	2,56	1	1,12	1,07	1,05
217719_at	EIF3S6IP	1,75	1,09	1,12	1,1	1,02
200647_x_at	EIF3S8	1,85	1,34	1,06	1,18	0,9
211938_at	EIF4B	2,26	1,09	0,87	0,96	0,91
211937_at	EIF4B	2,08	0,92	0,77	0,92	0,83

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
221539_at	EIF4EBP1	0,46	1,36	0,8	0,83	0,96
221773_at	ELK3	4,24	0,87	0,37	0,46	0,81
219134_at	ELTD1	7,25	0,83	0,32	0,31	1,04
213895_at	EMP1	2,87	1,09	0,34	0,38	0,9
201325_s_at	EMP1	17,54	1,61	0,15	0,26	0,57
201324_at	EMP1	23,08	2,01	0,13	0,24	0,54
217820_s_at	ENAH	0,31	0,76	5,59	3,26	1,72
201313_at	ENO2	3,1	1,49	0,53	0,65	0,81
204076_at	ENTPD4	1,85	1,14	1,12	1,04	1,08
210753_s_at	EPHB1	2,19	1,03	0,61	0,71	0,86
211898_s_at	EPHB1	1,99	1	0,8	0,79	1,02
221911_at	ETV1	3,07	0,75	0,2	0,2	1,04
221884_at	EVI1	2,3	0,93	0,65	0,62	1,05
211742_s_at	EVI2B	1,68	0,94	0,89	0,91	0,98
217838_s_at	EVL	0,51	0,88	1,8	1,4	1,29
221804_s_at	FAM45A	2,13	1,38	0,82	0,93	0,88
209683_at	FAM49A	2,16	1,06	0,59	0,64	0,91
203184_at	FBN2	4,2	1,15	0,34	0,47	0,73
213145_at	FBXL14	1,87	1,15	0,75	0,74	1,01
202271_at	FBXO28	2,96	1,14	0,91	1,01	0,89
202272_s_at	FBXO28	1,59	0,87	1,07	1,05	1,02
202305_s_at	FEZ2	1,79	1,06	0,91	0,81	1,12
215000_s_at	FEZ2	2,54	1,06	0,72	0,86	0,84
204421_s_at	FGF2	0,26	0,73	2,4	2,06	1,16
210299_s_at	FHL1	3,19	1	0,33	0,41	0,81
201540_at	FHL1	3,08	1,41	0,37	0,53	0,69
218980_at	FHOD3	2,55	1,18	0,41	0,44	0,92
214119_s_at	FKBP1A	2,21	1,02	0,62	0,71	0,86
210186_s_at	FKBP1A	2,05	1,03	0,61	0,7	0,86
204236_at	FLI1	2,36	1,31	0,47	0,68	0,68
222065_s_at	FLII	1,63	1,01	1,05	1,04	1,01
218614_at	FLJ10652	1,69	0,86	0,75	0,72	1,04
218999_at	FLJ11000	0,58	1,01	1,2	1	1,2
53720_at	FLJ11286	0,37	0,99	1,38	0,88	1,57
219418_at	FLJ12610	1,56	1,02	1,14	1,11	1,03
218962_s_at	FLJ13576	1,71	0,98	0,84	0,93	0,91
217750_s_at	FLJ13855	0,61	0,97	1,13	1,03	1,09
218719_s_at	FLJ13912	0,63	0,82	1,26	1,02	1,24
221908_at	FLJ14627	1,62	1,13	0,89	1,06	0,84
218986_s_at	FLJ20035	0,11	0,86	2,81	0,77	3,65
218460_at	FLJ20397	2,08	1,09	0,81	0,82	0,98
204359_at	FLRT2	3,22	0,96	0,96	0,86	1,11
218210_at	FN3KRP	1,65	0,9	1,01	1,02	0,99
218618_s_at	FNDC3B	0,55	0,97	2,25	1,99	1,13
204420_at	FOSL1	2,56	1,02	0,31	0,37	0,84
206018_at	FOXG1B	40,43	5,83	0,16	0,28	0,57
208782_at	FSTL1	0,28	1,24	5,17	4,65	1,11
208310_s_at	FSTL1	1,62	0,9	0,76	0,8	0,95

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
201637_s_at	FXR1	1,77	0,92	1,15	1,08	1,06
204451_at	FZD1	2,56	0,78	0,46	0,49	0,92
210220_at	FZD2	0,39	0,9	1,98	1,76	1,13
219683_at	FZD3	0,66	0,84	1	1,1	0,91
205483_s_at	G1P2	0,03	1,26	4,94	1,27	3,9
204415_at	G1P3	0,03	0,88	10,02	1,29	7,77
214772_at	G2	1,84	1,12	0,63	0,72	0,87
222235_s_at	GALNACT-2	2,08	0,94	1,21	1,22	0,99
202269_x_at	GBP1	0,13	0,69	4,74	2,53	1,88
202270_at	GBP1	0,19	0,69	4,76	2,72	1,75
204224_s_at	GCH1	0,33	0,99	1,58	0,85	1,87
205100_at	GFPT2	3,71	1,04	0,3	0,34	0,87
213552_at	GLCE	2,12	1,09	0,66	0,78	0,84
209276_s_at	GLRX	2,78	0,99	0,41	0,42	0,99
217807_s_at	GLTSCR2	2,36	1,33	0,97	1,03	0,94
215001_s_at	GLUL	1,71	0,94	0,98	0,82	1,19
204187_at	GMPR	0,59	0,94	0,8	0,68	1,18
204115_at	GNG11	4,06	1,41	0,29	0,35	0,83
201956_s_at	GNPAT	1,63	1,26	0,95	0,99	0,96
202382_s_at	GNPDA1	2,07	0,94	0,91	0,99	0,92
201141_at	GPNMB	5,7	1,25	0,63	0,88	0,72
209409_at	GRB10	0,62	1,03	1,42	1,55	0,92
221050_s_at	GTPBP2	0,45	1,21	1,04	1,18	0,88
212205_at	H2AFV	4,06	1	0,71	0,93	0,77
212206_s_at	H2AFV	2,48	1,1	0,7	0,86	0,82
214500_at	H2AFY	2,28	0,96	0,65	0,78	0,83
208631_s_at	HADHA	1,73	1,04	0,94	1,05	0,9
201007_at	HADHB	1,58	0,98	0,87	0,93	0,94
201145_at	HAX1	0,51	1,07	1,6	1,24	1,29
203821_at	HBEGF	0,55	0,87	2,74	2,46	1,11
38037_at	HBEGF	0,53	1,01	2,16	2,04	1,06
206082_at	HCP5	0,36	0,76	1,34	0,95	1,41
209526_s_at	HDGFRP3	1,9	1,1	0,9	0,88	1,02
216693_x_at	HDGFRP3	1,93	1,03	0,92	1,09	0,85
203974_at	HDHD1A	1,62	0,98	0,82	0,81	1,02
218450_at	HEBP1	2,64	1,27	0,81	0,88	0,92
203430_at	HEBP2	1,81	1,14	0,81	0,87	0,94
219863_at	HERC5	0,14	0,74	2	0,86	2,32
219352_at	HERC6	0,13	0,94	2,64	1,11	2,38
200697_at	HK1	2,48	1,3	0,78	0,95	0,81
215313_x_at	HLA-A	0,24	1,14	1,34	1,05	1,28
213932_x_at	HLA-A	0,37	1,15	1,26	0,91	1,39
208729_x_at	HLA-B	0,1	1,14	2,16	1,3	1,66
211911_x_at	HLA-B	0,11	1,1	2,05	1,34	1,53
209140_x_at	HLA-B	0,15	1,14	2,09	1,48	1,41
208812_x_at	HLA-C	0,2	1,3	1,56	1,06	1,47
214459_x_at	HLA-C	0,26	1,13	1,47	1,1	1,34
211799_x_at	HLA-C	0,3	1,13	1,34	0,96	1,39

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
216526_x_at	HLA-C	0,27	1,22	1,53	1,13	1,35
217478_s_at	HLA-DMA	0,59	0,85	1,17	1,07	1,09
217456_x_at	HLA-E	0,55	1,06	1,04	1,03	1,01
200905_x_at	HLA-E	0,53	1,27	1,18	1,14	1,03
221875_x_at	HLA-F	0,21	1,05	1,59	0,97	1,64
204806_x_at	HLA-F	0,27	1,06	1,52	1,04	1,45
221978_at	HLA-F	0,59	0,92	0,98	0,99	0,99
211529_x_at	HLA-G	0,3	1,08	1,33	1,07	1,24
211528_x_at	HLA-G	0,39	1	1,32	1,19	1,11
211530_x_at	HLA-G	0,37	1,06	1,28	1,04	1,23
210514_x_at	HLA-G	0,38	1	1,45	1,04	1,39
217436_x_at	HLA-J	0,37	0,98	1,18	0,96	1,23
210457_x_at	HMGA1	4,4	0,7	0,16	0,17	0,94
206074_s_at	HMGA1	7,42	0,82	0,17	0,19	0,91
208025_s_at	HMGA2	11,43	0,88	0,16	0,16	0,99
222020_s_at	HNT	5,49	1,13	0,36	0,48	0,74
36030_at	HOM-TES-103	1,71	1,13	0,75	0,92	0,82
211597_s_at	HOP	1,82	0,87	0,61	0,87	0,7
213147_at	HOXA10	0,59	0,88	2,05	1,83	1,12
212552_at	HPCAL1	2,77	1,31	0,34	0,39	0,87
205462_s_at	HPCAL1	2,59	1,11	0,3	0,34	0,89
200799_at	HSPA1A	2,97	1,22	0,87	1,09	0,8
200800_s_at	HSPA1A	2,58	1,32	0,79	0,91	0,88
208687_x_at	HSPA8	2,88	1,04	0,96	0,99	0,97
210338_s_at	HSPA8	2,35	0,91	0,95	0,87	1,09
203089_s_at	HTRA2	1,93	1,08	0,81	0,88	0,92
200825_s_at	HYOU1	0,51	1,19	1,13	1,23	0,92
219122_s_at	ICF45	1,5	1,07	1,26	1,2	1,04
212223_at	AFFYIDS	2,36	0,95	0,68	0,65	1,04
202411_at	IFI27	0	1,09	40,45	1,21	33,34
201422_at	IFI30	0,54	0,99	1,13	1,12	1,01
209417_s_at	IFI35	0,12	1,01	1,59	0,79	2,02
214453_s_at	IFI44	0,04	0,9	3,43	1,15	3
214059_at	IFI44	0,4	0,79	0,92	0,97	0,95
204439_at	IFI44L	0,02	0,97	2,62	0,89	2,95
219209_at	IFIH1	0,07	0,84	2,74	0,95	2,88
203153_at	IFIT1	0,02	1,16	8,37	1,08	7,74
217502_at	IFIT2	0,16	0,78	1,21	0,98	1,23
204747_at	IFIT3	0,11	0,93	1,94	0,74	2,62
203596_s_at	IFIT5	0,49	1,15	1,04	0,93	1,13
203595_s_at	IFIT5	0,4	1,02	1,27	1,15	1,11
201601_x_at	IFITM1	0,04	1,06	2,64	0,78	3,38
214022_s_at	IFITM1	0,03	0,98	3,24	0,77	4,19
201315_x_at	IFITM2	0,27	1,07	1,05	0,77	1,37
212203_x_at	IFITM3	0,21	1,22	1,15	0,83	1,4
219684_at	IFRG28	0,35	0,8	1,25	0,97	1,29
203851_at	IGFBP6	0,43	0,63	0,58	0,47	1,23
201163_s_at	IGFBP7	0,06	0,56	5,74	2,49	2,3

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
205992_s_at	IL15	0,49	0,9	1,65	1,22	1,35
205067_at	IL1B	10,37	0,99	0,08	0,09	0,94
39402_at	IL1B	12,75	0,95	0,11	0,11	0,98
221658_s_at	IL21R	0,55	0,98	0,94	0,9	1,04
205207_at	IL6	0,24	1,02	2,28	1,26	1,81
204465_s_at	INA	0,58	0,93	1,1	1,01	1,1
210587_at	INHBE	0,33	1,02	1	0,95	1,05
208436_s_at	IRF7	0,21	0,96	2,36	1,02	2,32
204698_at	ISG20	0,18	0,88	0,83	0,6	1,39
33304_at	ISG20	0,24	0,91	0,94	0,63	1,51
203882_at	ISGF3G	0,22	0,88	2,16	0,82	2,64
218893_at	ISOC2	0,56	0,98	1,09	0,98	1,11
215177_s_at	ITGA6	4,12	0,84	0,21	0,26	0,83
201656_at	ITGA6	4,91	0,92	0,25	0,27	0,92
204627_s_at	ITGB3	0,49	0,97	1,06	1,16	0,92
217732_s_at	ITM2B	0,44	0,78	1,15	0,81	1,42
201189_s_at	ITPR3	2,01	1,1	0,84	0,86	0,99
209298_s_at	ITSN1	1,98	0,78	0,81	0,97	0,84
212689_s_at	JMJD1A	1,89	0,97	0,83	0,69	1,2
205206_at	KAL1	3,39	0,9	0,29	0,34	0,86
206078_at	KALRN	0,4	0,89	2,27	1,81	1,25
221584_s_at	KCNMA1	1,87	1,03	0,75	0,84	0,89
212806_at	KIAA0367	0,28	0,68	1,66	0,93	1,79
212314_at	KIAA0746	0,21	1,01	2,19	1,21	1,8
212311_at	KIAA0746	0,49	0,95	1,23	0,96	1,28
214995_s_at	KIAA0907	0,54	0,87	0,97	0,75	1,29
200907_s_at	KIAA0992	0,39	1,25	3,26	2,6	1,25
200897_s_at	KIAA0992	0,36	1,09	3,34	2,6	1,29
200906_s_at	KIAA0992	0,5	0,94	1,93	1,72	1,13
218362_s_at	KIAA1008	1,67	1,15	1,02	0,88	1,16
212327_at	KIAA1102	4,17	1,37	0,54	0,69	0,77
212328_at	KIAA1102	6,88	1,71	0,42	0,84	0,5
219520_s_at	KIAA1280	1,59	1,06	0,59	0,68	0,87
212236_x_at	KRT17	0,15	1,18	3,93	1,45	2,71
205157_s_at	KRT17	0,13	1,02	4,18	1,31	3,19
201505_at	LAMB1	2,8	0,79	0,43	0,33	1,32
205569_at	LAMP3	0,44	0,92	1,21	1,02	1,18
217933_s_at	LAP3	0,22	0,87	1,56	0,87	1,78
213261_at	LBA1	0,36	0,88	1,04	1,03	1,01
218717_s_at	LEPREL1	0,32	1,1	1,61	1,49	1,08
207170_s_at	LETMD1	1,94	1,13	0,92	1,05	0,88
200923_at	LGALS3BP	0,25	1,03	1,19	0,7	1,7
201212_at	LGMN	0,33	0,74	1,97	1,2	1,64
219364_at	LGP2	0,57	1,04	1,3	1	1,3
213880_at	LGR5	3,7	0,9	0,54	0,51	1,06
210393_at	LGR5	1,65	0,84	0,91	0,98	0,93
212658_at	LHFPL2	1,63	1,21	0,53	0,56	0,95
218191_s_at	LMBRD1	1,86	1,08	0,82	0,89	0,91

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
218574_s_at	LMCD1	0,25	1,12	2,75	2,37	1,16
203320_at	LNK	1,78	0,89	0,32	0,34	0,94
212098_at	LOC151162	2,2	1,43	0,64	0,71	0,9
200776_s_at	LOC151579	1,84	0,74	0,65	0,59	1,11
213360_s_at	LOC340318	1,85	1,21	0,98	1,04	0,95
216565_x_at	LOC391020	0,25	1,08	1,05	0,82	1,28
214110_s_at	LOC440886	2,06	1,22	0,66	0,8	0,83
209679_s_at	LOC57228	1,99	0,86	0,53	0,61	0,87
221823_at	LOC90355	2,14	0,71	0,36	0,48	0,75
213224_s_at	LOC92482	2,08	1,14	0,83	0,87	0,95
213220_at	LOC92482	1,92	1,36	1,06	1,26	0,84
208771_s_at	LTA4H	1,97	1,25	0,92	1,01	0,91
202729_s_at	LTBP1	1,57	1,02	0,48	0,57	0,85
204682_at	LTBP2	2,31	1,01	0,24	0,31	0,76
201744_s_at	LUM	0,33	1,11	2,24	1,9	1,18
202145_at	LY6E	0,22	1,11	1,04	0,79	1,31
212909_at	LYPD1	1,98	1,02	0,27	0,3	0,91
208634_s_at	MACF1	2,03	1,07	0,59	0,56	1,06
207358_x_at	MACF1	2,25	1	0,65	0,7	0,94
204777_s_at	MAL	0,63	0,94	0,98	0,93	1,06
203514_at	MAP3K3	1,36	0,96	0,98	0,97	1,01
216199_s_at	MAP3K4	2,19	0,97	0,89	1,09	0,81
203837_at	MAP3K5	3,26	1,1	0,35	0,45	0,77
203836_s_at	MAP3K5	1,97	0,99	0,51	0,62	0,82
210058_at	MAPK13	1,78	0,96	0,68	0,76	0,9
207121_s_at	MAPK6	0,52	1,09	1,82	1,62	1,12
203218_at	MAPK9	1,75	1,09	0,84	0,91	0,92
55065_at	MARK4	1,65	1,35	0,96	1,01	0,95
40016_g_at	MAST4	1,62	0,99	0,52	0,57	0,91
202350_s_at	MATN2	0,25	0,78	3,36	2,05	1,64
209087_x_at	MCAM	0,53	1,63	1,98	2,3	0,86
210869_s_at	MCAM	0,49	1,69	1,85	2,34	0,79
214077_x_at	MEIS4	0,48	0,77	1,41	1,03	1,37
206028_s_at	MERTK	1,71	1,26	0,8	0,79	1,02
213457_at	MFHAS1	1,7	0,77	0,6	0,49	1,22
214696_at	MGC14376	0,45	0,98	1,63	1,68	0,97
220305_at	MGC3260	1,66	1,18	1,03	1,07	0,97
213392_at	MGC35048	1,63	0,98	0,85	0,84	1,01
217553_at	MGC87042	2,1	0,97	0,76	0,81	0,94
218211_s_at	MLPH	2,83	0,67	0,3	0,3	1
203435_s_at	MME	6,64	0,9	0,46	0,57	0,81
203434_s_at	MME	10,88	1,08	0,29	0,4	0,71
202167_s_at	MMS19L	2	1,07	0,81	0,99	0,82
205330_at	MN1	0,57	0,8	1,27	1,19	1,07
221619_s_at	MTCH1	2,29	1,44	0,76	0,84	0,91
216095_x_at	MTMR1	1,71	1,02	0,69	0,82	0,84
203037_s_at	MTSS1	2,13	0,77	0,63	0,51	1,22
202959_at	MUT	2,01	1,07	0,87	0,89	0,98

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
202086_at	MX1	0,02	1,4	10,82	0,92	11,77
204994_at	MX2	0,05	1,13	2,94	1,08	2,73
202431_s_at	MYC	0,51	0,82	1,34	1,28	1,05
209124_at	MYD88	0,51	0,94	1,1	0,84	1,3
201976_s_at	MYO10	2,45	0,86	0,55	0,56	0,98
220227_at	NA	2,97	1,35	0,46	0,54	0,85
218613_at	NA	1,75	0,93	1,1	1,02	1,08
218181_s_at	NA	2,87	1,09	0,41	0,42	0,97
219999_at	NA	1,74	0,96	0,9	0,98	0,92
215718_s_at	NA	1,62	1,04	0,86	0,98	0,88
219353_at	NA	2,09	0,96	0,83	0,85	0,98
202149_at	NA	0,4	0,88	3,55	2,7	1,32
217830_s_at	NA	1,66	1,07	0,93	1,06	0,88
216457_s_at	NA	1,77	1,08	1,07	1,09	0,98
213567_at	NA	2,13	1,08	0,81	0,87	0,93
209272_at	NAB1	2,07	0,95	0,62	0,63	0,97
208047_s_at	NAB1	2,39	0,75	0,82	0,76	1,08
202926_at	NAG	1,99	1,12	1,06	1,11	0,96
200597_at	NANOS1	1,76	0,93	0,9	0,94	0,96
208752_x_at	NAP1L1	1,99	1,03	0,98	1	0,99
212967_x_at	NAP1L1	2,11	1,08	0,96	1,03	0,93
203315_at	NCK2	2,1	1,09	0,66	0,66	1
212867_at	NCOA2	1,86	0,92	0,67	0,7	0,97
200856_x_at	NCOR1	1,67	1,01	0,98	0,96	1,02
220864_s_at	NDUFA13	0,53	1,16	1,46	1,3	1,12
212445_s_at	NEDD4L	2,56	1,04	0,77	0,86	0,89
212448_at	NEDD4L	2,89	0,98	0,64	0,73	0,88
201830_s_at	NET1	1,91	0,76	0,43	0,49	0,86
200759_x_at	NFE2L1	0,68	1,01	0,97	0,93	1,04
203964_at	NMI	0,27	0,81	1,36	0,66	2,07
213462_at	NPAS2	5,28	1	0,19	0,23	0,84
39549_at	NPAS2	3,78	1,11	0,19	0,22	0,84
205460_at	NPAS2	2,01	0,79	0,36	0,38	0,96
39548_at	NPAS2	2,07	1,16	0,41	0,53	0,77
206801_at	NPPB	0,15	1,18	11,35	16,79	0,68
206343_s_at	NRG1	0,27	0,98	2,78	2,29	1,21
206237_s_at	NRG1	0,63	0,84	1,75	1,53	1,15
208241_at	NRG1	0,61	0,96	1,47	1,3	1,12
212298_at	NRP1	2,55	0,55	0,33	0,23	1,42
220987_s_at	NUAK2	0,33	0,8	1,99	1,35	1,47
212605_s_at	NUDT3	2,45	1,12	0,65	0,77	0,85
205552_s_at	OAS1	0,06	0,85	2,12	1,03	2,06
202869_at	OAS1	0,07	0,91	2,61	0,82	3,2
204972_at	OAS2	0,09	0,97	2,1	1,07	1,96
206553_at	OAS2	0,46	0,92	1,27	0,99	1,27
218400_at	OAS3	0,09	1,03	3,2	1,09	2,94
210797_s_at	OASL	0,12	0,89	1,7	0,83	2,06
205660_at	OASL	0,14	0,78	2,14	0,86	2,48

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
219100_at	OBFC1	1,75	1,16	0,5	0,52	0,95
209925_at	OCLN	0,54	0,92	0,98	1,14	0,86
213125_at	OLFML2B	0,43	0,78	1,12	0,96	1,16
209627_s_at	OSBPL3	2,07	0,94	0,75	0,7	1,07
213568_at	OSR2	0,43	0,74	1,16	1,24	0,94
209230_s_at	P8	0,45	1,12	1,11	0,91	1,22
201064_s_at	PABPC4	2,61	0,95	1,01	0,96	1,05
218543_s_at	PARP12	0,19	1	1,88	1	1,88
216822_x_at	PARP4	0,72	1,2	1,09	1,05	1,03
204004_at	PAWR	0,54	0,77	1,88	1,88	1
204082_at	PBX3	1,95	0,85	1,02	0,81	1,26
208620_at	PCBP1	2,01	1,16	0,87	0,99	0,87
204031_s_at	PCBP2	2,02	1,31	0,97	1,15	0,84
209079_x_at	PCDHGA1	2,81	1,5	0,43	0,68	0,64
216352_x_at	PCDHGA3	2,02	1,08	0,52	0,68	0,77
205717_x_at	PCDHGC3	2,71	1,45	0,42	0,62	0,68
211066_x_at	PCDHGC3	2,81	1,36	0,47	0,78	0,6
215836_s_at	PCDHGC3	2,65	1,53	0,43	0,58	0,74
202847_at	PCK2	0,39	1,06	1,06	0,9	1,17
206474_at	PCTK2	2,33	0,78	0,41	0,46	0,89
221918_at	PCTK2	4,28	1,14	0,24	0,33	0,72
212390_at	PDE4DIP	2,4	1	0,72	0,67	1,07
205463_s_at	PDGFA	1,57	1,01	1,09	1,09	1
211048_s_at	PDIA4	0,55	0,99	1	0,92	1,09
218691_s_at	PDLIM4	0,66	0,94	1,27	1,22	1,04
221898_at	PDPN	2,7	1,31	0,42	0,51	0,82
217744_s_at	PERP	3,76	0,94	0,56	0,53	1,06
203972_s_at	PEX3	1,78	1,06	0,81	0,92	0,89
200886_s_at	PGAM1	1,7	1,31	0,94	0,92	1,02
200738_s_at	PGK1	1,7	1,04	1,04	0,92	1,13
219126_at	PHF10	2,21	1,25	0,43	0,46	0,94
221816_s_at	PHF11	0,28	0,84	2,87	1,47	1,95
212660_at	PHF15	1,87	1,04	0,6	0,67	0,9
217954_s_at	PHF3	2,15	1,08	0,95	1,07	0,88
217999_s_at	PHLDA1	3,32	0,74	0,27	0,25	1,07
218000_s_at	PHLDA1	2,88	0,77	0,23	0,25	0,93
217997_at	PHLDA1	4,57	0,86	0,09	0,1	0,92
217996_at	PHLDA1	7,11	0,63	0,09	0,12	0,79
205078_at	PIGF	1,71	0,97	0,75	0,77	0,97
205077_s_at	PIGF	1,92	1,15	0,75	0,74	1,01
219014_at	PLAC8	0,15	0,64	6,22	2,87	2,17
205372_at	PLAG1	3,44	1,52	0,65	0,91	0,72
201860_s_at	PLAT	4,84	0,98	0,05	0,08	0,65
211668_s_at	PLAU	6,29	0,82	0,06	0,09	0,68
205479_s_at	PLAU	6,23	1,03	0,07	0,1	0,73
210845_s_at	PLAUR	3,18	1,01	0,35	0,37	0,95
205934_at	PLCL1	1,83	1,3	0,33	0,4	0,82
219024_at	PLEKHA1	1,84	0,99	0,77	0,75	1,03

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
209210_s_at	PLEKHC1	0,35	1,1	2,74	2,47	1,11
201136_at	PLP2	1,94	1	0,85	0,87	0,98
202446_s_at	PLSCR1	0,16	0,81	1,73	0,67	2,59
202430_s_at	PLSCR1	0,19	0,93	1,64	0,78	2,09
217841_s_at	PME-1	0,32	0,82	2,34	2,13	1,1
49077_at	PME-1	0,41	0,82	2,21	2,12	1,04
202337_at	PMF1	2,17	1,44	0,93	1,14	0,82
219926_at	POPDC3	1,71	1,35	0,84	0,8	1,06
209529_at	PPAP2C	2,22	1,03	0,52	0,61	0,85
203496_s_at	PPARBP	0,62	0,96	1,06	1,06	1
204517_at	PPIC	0,37	1,08	3,22	2,72	1,18
204518_s_at	PPIC	0,45	1,18	2,19	2,09	1,05
212686_at	PPM1H	0,51	0,82	1,31	1,18	1,11
202432_at	PPP3CB	1,89	1,08	0,92	0,9	1,03
218292_s_at	PRKAG2	1,78	0,95	0,56	0,59	0,94
209049_s_at	PRKCBP1	2,12	0,97	0,49	0,42	1,15
209048_s_at	PRKCBP1	1,67	0,91	0,58	0,55	1,06
215707_s_at	PRNP	3,06	0,86	0,1	0,12	0,79
207808_s_at	PROS1	0,49	0,83	1,06	0,83	1,27
202126_at	PRPF4B	2,11	0,81	1,06	0,94	1,13
208447_s_at	PRPS1	0,39	0,84	3,7	3,06	1,21
47069_at	PRR5	0,71	0,87	1,33	1,42	0,94
202880_s_at	PSCD1	0,59	0,94	1,61	1,28	1,26
203355_s_at	PSD3	2,21	0,94	1,5	1,34	1,12
204830_x_at	PSG5	0,32	0,76	2,42	1,36	1,78
202659_at	PSMB10	0,54	0,94	0,84	0,68	1,23
209040_s_at	PSMB8	0,43	1,18	0,8	0,77	1,04
204279_at	PSMB9	0,25	1,13	0,71	0,61	1,17
200830_at	PSMD2	2,7	1,61	0,68	0,87	0,78
200814_at	PSME1	0,45	0,99	1,2	0,93	1,29
201762_s_at	PSME2	0,33	1,09	1,21	0,89	1,36
204053_x_at	PTEN	3,14	1,32	0,82	0,95	0,87
217492_s_at	PTENP1	3,15	1,15	0,98	1,17	0,84
204897_at	PTGER4	4,09	0,99	0,28	0,3	0,95
209465_x_at	PTN	0,3	0,82	1,33	1,19	1,12
211737_x_at	PTN	0,2	0,58	1,93	0,86	2,25
209466_x_at	PTN	0,42	0,74	1,65	1,11	1,49
204201_s_at	PTPN13	0,39	0,86	1,88	1,57	1,19
204020_at	PURA	2,26	0,96	0,77	0,96	0,8
201087_at	PXN	1,87	1,18	0,5	0,56	0,88
219681_s_at	RAB11FIP1	0,44	0,73	1,48	1,38	1,07
203884_s_at	RAB11FIP2	1,94	1,09	0,82	0,93	0,87
213405_at	RAB22A	2,16	0,99	0,79	0,75	1,06
217764_s_at	RAB31	1,76	0,93	0,68	0,65	1,05
203581_at	RAB4A	2,88	1,01	1,01	1,03	0,98
203582_s_at	RAB4A	2,92	1,04	0,7	0,9	0,79
213970_at	RABL3	1,59	0,92	0,95	1,01	0,94
202100_at	RALB	1,74	1,04	0,74	0,71	1,04

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
221872_at	RARRES1	0,54	0,66	0,66	0,66	1
209496_at	RARRES2	0,56	0,9	1,14	1,12	1,01
205801_s_at	RASGRP3	0,49	1,04	1,4	1,13	1,23
211686_s_at	RBM13	0,54	1,1	1,29	1,31	0,99
203423_at	RBP1	0,59	0,86	1,18	1,06	1,11
214408_s_at	RFPL3S	0,69	1,01	1,05	1,04	1,01
202963_at	RFX5	0,51	0,91	1,19	0,81	1,46
204319_s_at	RGS10	4,64	1,15	0,44	0,56	0,79
204316_at	RGS10	1,64	1,21	0,76	0,79	0,96
220334_at	RGS17	2,19	1,25	0,6	0,56	1,06
218686_s_at	RHBDF1	2,09	1,1	0,64	0,68	0,95
202976_s_at	RHOBTB3	3,71	1,62	0,92	0,99	0,93
219045_at	RHOF	1,6	0,91	0,71	0,69	1,02
209684_at	RIN2	2,72	1	0,42	0,42	0,99
213338_at	RIS1	8,04	0,69	0,1	0,11	0,95
209510_at	RNF139	0,65	1,04	1,09	0,96	1,13
202762_at	ROCK2	1,71	0,89	1,12	1,01	1,11
207624_s_at	RPGR	1,59	1,03	0,79	0,75	1,06
217379_at	RPL10	1,67	1,09	1,07	1,2	0,9
217266_at	RPL15	1,48	0,88	1,05	1,17	0,9
221476_s_at	RPL15	2,28	1,08	0,73	0,76	0,96
200937_s_at	RPL5	1,99	0,92	1,01	0,93	1,09
212912_at	RPS6KA2	7,22	1,38	0,3	0,38	0,8
204906_at	RPS6KA2	2,96	1,34	0,44	0,53	0,83
218909_at	RPS6KC1	0,54	0,88	1,59	1,32	1,2
218088_s_at	RRAGC	1,95	1,1	0,94	1,02	0,92
213797_at	RSAD2	0,04	0,84	1,57	1,02	1,55
212507_at	RW1	2,32	1,13	0,64	0,7	0,91
212845_at	SAMD4	0,51	1,01	2,58	2,43	1,06
219691_at	SAMD9	0,29	0,74	1,66	0,97	1,7
204502_at	SAMHD1	0,42	0,95	1,13	0,98	1,16
41644_at	SASH1	2,13	1,23	0,51	0,58	0,87
213236_at	SASH1	1,82	1,11	0,55	0,63	0,87
213435_at	SATB2	6,24	1,44	0,42	0,65	0,63
212157_at	SDC2	0,46	0,81	1,33	0,96	1,39
212154_at	SDC2	0,2	0,64	2,17	0,89	2,44
202071_at	SDC4	0,59	0,81	1,52	1,32	1,15
201290_at	SEC11L1	1,65	0,99	1,07	1,02	1,05
202061_s_at	SEL1L	0,52	0,91	1,05	1,02	1,03
209723_at	SERPINB9	0,42	0,67	1,4	0,95	1,48
212190_at	SERPINE2	3,16	0,85	0,48	0,52	0,91
202656_s_at	SERTAD2	2,06	1,13	1,37	1,53	0,9
212322_at	SGPL1	0,59	0,92	1,09	1,22	0,89
201811_x_at	SH3BP5	1,98	0,98	0,59	0,62	0,96
202254_at	SIPA1L1	1,83	0,98	0,72	0,66	1,09
213600_at	SIPA1L3	1,71	1	0,71	0,69	1,04
219874_at	SLC12A8	0,47	0,93	1,29	1,06	1,21
213549_at	SLC18A2	2,87	1	0,71	0,78	0,9

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
208916_at	SLC1A5	0,5	1,09	1,18	1,34	0,88
201920_at	SLC20A1	4,87	1	0,2	0,2	0,99
212826_s_at	SLC25A6	1,81	1,2	1,07	1,06	1,01
214830_at	SLC38A6	2,3	0,85	0,54	0,64	0,85
207043_s_at	SLC6A9	0,69	0,93	1,09	1,1	0,99
201195_s_at	SLC7A5	0,22	1,04	5,14	5,14	1
214860_at	SLC9A7	1,64	0,89	0,75	0,71	1,06
219911_s_at	SLCO4A1	2,09	0,93	0,66	0,75	0,88
206874_s_at	SLK	3,75	1,24	0,63	0,87	0,72
202508_s_at	SNAP25	2,14	0,88	0,67	0,68	0,98
213221_s_at	SNF1LK2	1,94	0,95	0,87	0,87	1
203316_s_at	SNRPE	1,74	1,06	1,2	1,19	1,01
213364_s_at	SNX1	2,08	1,06	0,84	0,86	0,98
200067_x_at	SNX3	1,71	0,97	0,88	1,08	0,82
209647_s_at	SOCS5	2,16	0,86	0,54	0,63	0,86
208127_s_at	SOCS5	1,75	0,82	0,71	0,68	1,05
218087_s_at	SORBS1	2,16	1,09	0,48	0,52	0,94
202935_s_at	SOX9	4,17	0,99	0,15	0,19	0,82
202936_s_at	SOX9	5,69	0,85	0,13	0,16	0,79
209762_x_at	SP110	0,4	0,98	1,18	0,88	1,34
208012_x_at	SP110	0,46	0,91	1,16	0,88	1,33
209761_s_at	SP110	0,41	0,84	1,21	0,8	1,5
200053_at	SPAG7	1,78	1	0,94	0,92	1,03
200665_s_at	SPARC	0,15	1,06	3,47	3,04	1,14
212667_at	SPARC	0,28	1,21	2,6	3,04	0,86
202441_at	SPFH1	1,64	1,04	0,89	0,93	0,95
206272_at	SPHAR	2,26	0,88	0,86	0,88	0,98
202363_at	SPOCK	0,51	0,73	1,13	0,77	1,46
212458_at	SPRED2	2,02	1,02	0,51	0,58	0,88
204011_at	SPRY2	2,87	0,95	0,37	0,36	1,04
221489_s_at	SPRY4	1,96	0,94	0,69	0,67	1,03
204955_at	SRPX	3,21	1,19	0,29	0,33	0,87
202506_at	SSFA2	3,91	0,83	0,28	0,31	0,9
200652_at	SSR2	2,02	1,43	1,06	1,3	0,82
207040_s_at	ST13	1,82	1,09	0,89	0,9	0,98
210942_s_at	ST3GAL6	3,66	1,14	0,55	0,72	0,76
213355_at	ST3GAL6	2,77	0,91	0,7	0,68	1,03
202294_at	STAG1	2,02	1,14	0,9	0,94	0,96
202293_at	STAG1	2,12	0,82	0,94	0,99	0,94
221610_s_at	STAP2	0,61	1,03	1,06	1,07	0,99
213820_s_at	STARD5	0,59	0,97	1,09	1,05	1,03
209969_s_at	STAT1	0,11	1,08	2,78	0,97	2,87
M97935_MA_at	STAT1	0,18	0,77	1,44	0,83	1,73
M97935_MB_at	STAT1	0,19	0,87	1,65	0,94	1,76
M97935_5_at	STAT1	0,22	0,73	1,38	0,91	1,52
M97935_3_at	STAT1	0,2	0,99	2,1	0,96	2,18
200887_s_at	STAT1	0,15	0,93	2,69	0,9	2,99
204595_s_at	STC1	2,47	0,85	0,2	0,24	0,82

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
204597_x_at	STC1	2,38	1,02	0,22	0,26	0,87
205542_at	STEAP1	3,6	1,18	0,48	0,53	0,91
218424_s_at	STEAP3	1,56	0,88	0,77	0,67	1,15
202786_at	STK39	2,99	0,94	0,6	0,61	0,99
201060_x_at	STOM	0,56	0,81	1,51	1,57	0,96
204729_s_at	STX1A	1,62	1,12	0,48	0,59	0,81
202260_s_at	STXBP1	1,83	1,09	0,78	0,77	1,01
209197_at	SYT11	2,22	1,47	0,77	0,91	0,85
209198_s_at	SYT11	2,14	1,38	0,88	1,05	0,84
220761_s_at	TAOK3	2,48	1,36	0,5	0,57	0,88
202307_s_at	TAP1	0,26	1,3	1,27	1,07	1,19
218746_at	TAPBPL	0,62	0,85	0,95	0,86	1,1
218747_s_at	TAPBPL	0,67	0,87	0,9	0,85	1,06
212764_at	TCF8	3,15	0,97	0,55	0,64	0,86
213361_at	TDRD7	0,37	0,94	1,41	1	1,41
202720_at	TES	0,3	0,9	2,98	2,55	1,17
202719_s_at	TES	0,33	1,01	2,18	2,04	1,07
209278_s_at	TFPI2	6,59	0,42	0,06	0,06	0,98
209277_at	TFPI2	5,66	0,57	0,06	0,07	0,98
209909_s_at	TGFB2	0,16	0,54	5,14	3,17	1,62
220407_s_at	TGFB2	0,21	0,59	2,72	1,86	1,46
209908_s_at	TGFB2	0,27	0,56	1,57	1,43	1,09
208944_at	TGFBR2	4,93	1,03	0,18	0,18	0,99
201042_at	TGM2	6,32	0,86	0,08	0,12	0,62
204565_at	THEM2	0,43	0,84	1,53	1,12	1,37
204468_s_at	TIE1	1,64	0,97	0,78	0,98	0,8
201149_s_at	TIMP3	1,59	0,8	0,81	0,82	0,99
203221_at	TLE1	1,73	1,21	0,96	0,82	1,16
206271_at	TLR3	0,27	0,78	1,21	1,02	1,19
201645_at	TNC	0,27	0,56	2,55	1,56	1,63
204932_at	TNFRSF11B	1,91	0,9	0,65	0,65	1
204933_s_at	TNFRSF11B	1,87	0,88	0,72	0,69	1,04
206467_x_at	TNFRSF6B	2,34	0,73	0,16	0,14	1,15
207536_s_at	TNFRSF9	0,33	0,87	1,56	1,05	1,48
211786_at	TNFRSF9	0,66	0,91	1,13	1,1	1,03
202687_s_at	TNFSF10	0,06	0,65	1,91	1	1,91
214329_x_at	TNFSF10	0,08	0,59	1,7	1,06	1,61
202688_at	TNFSF10	0,05	0,53	2,96	0,67	4,41
206508_at	TNFSF7	0,44	0,72	1,31	0,89	1,47
202561_at	TNKS	2,03	1,33	0,9	1,12	0,8
212635_at	TNPO1	2,11	0,78	1,02	0,99	1,03
214667_s_at	TP53I11	0,68	1,02	1,11	1,06	1,05
210987_x_at	TPM1	0,39	1,2	3,12	3,28	0,95
210986_s_at	TPM1	0,41	0,93	2,91	2,79	1,04
206116_s_at	TPM1	0,4	1,23	4,42	4,69	0,94
200743_s_at	TPP1	2,01	1,36	0,91	0,97	0,94
204140_at	TPST1	1,72	1,22	0,54	0,62	0,86
216449_x_at	TRA1	0,43	0,7	1,41	1,25	1,13

AffyAFFYID	SYMBOL	ER vs EB	EB U0 48	ER U0 48	ER U0 96	ER 96vs48
204658_at	TRA2A	0,59	1,03	1,12	1,18	0,95
35254_at	TRAFD1	0,67	0,98	1,35	1,29	1,04
219937_at	TRHDE	4,46	0,91	0,31	0,4	0,78
204341_at	TRIM16	0,42	1,62	3,67	3,62	1,01
202342_s_at	TRIM2	1,86	1,2	0,64	0,75	0,86
204804_at	TRIM21	0,6	1,03	1,01	0,95	1,06
213293_s_at	TRIM22	0,06	0,85	1,79	1,1	1,63
204732_s_at	TRIM23	1,59	0,95	1,1	1,23	0,89
221012_s_at	TRIM8	2,77	1,26	0,69	0,94	0,74
209859_at	TRIM9	0,58	0,8	1,08	1,07	1
205803_s_at	TRPC1	1,85	1,12	0,85	0,84	1
220818_s_at	TRPC4	0,54	0,88	1,91	1,83	1,04
220817_at	TRPC4	0,43	0,95	1,82	1,79	1,02
208763_s_at	TSC22D3	0,42	0,93	1,54	1,36	1,13
219481_at	TTC13	1,8	1	0,86	0,98	0,88
208073_x_at	TTC3	2,16	0,96	1,08	1,09	1
210645_s_at	TTC3	2,2	1,01	1,12	0,94	1,19
202266_at	TTRAP	1,93	1,08	1,08	1,02	1,06
214023_x_at	TUBB-PARALOG	0,24	2,19	1,59	2,56	0,62
205807_s_at	TUFT1	0,19	1,03	4,95	3,47	1,43
219201_s_at	TWSG1	0,5	0,83	1,18	1,24	0,96
203281_s_at	UBE1L	0,6	0,91	0,95	0,84	1,14
1294_at	UBE1L	0,59	0,98	1,03	0,9	1,14
208760_at	UBE2I	2,41	1,11	0,62	0,72	0,86
200676_s_at	UBE2L3	1,7	1,12	0,76	0,88	0,86
201649_at	UBE2L6	0,22	1,24	1,2	0,87	1,38
208998_at	UCP2	0,39	0,86	2,06	1,45	1,42
217797_at	UFC1	1,6	1,14	1,15	1,12	1,03
204881_s_at	UGCG	0,47	0,85	1,78	1,2	1,48
209137_s_at	USP10	1,79	1,01	0,86	0,91	0,94
219211_at	USP18	0,08	0,94	1,76	0,85	2,06
217829_s_at	USP39	1,73	1,15	0,95	0,99	0,96
219675_s_at	UXS1	1,9	0,98	0,53	0,51	1,05
200628_s_at	WARS	0,28	0,75	0,93	0,86	1,09
200629_at	WARS	0,27	0,97	0,93	0,9	1,03
204042_at	WASF3	1,71	0,99	0,66	0,75	0,88
202250_s_at	WDR42A	2,22	1,17	0,71	0,81	0,88
219628_at	WIG1	1,81	0,99	0,8	0,81	0,99
202031_s_at	WIPI-2	1,67	1,07	1,05	1,1	0,96
208642_s_at	XRCC5	1,65	1,07	0,97	0,95	1,02
220104_at	ZC3HAV1	0,31	0,87	1,65	1,03	1,6
212655_at	ZCCHC14	2,05	1,05	0,95	1,05	0,9
37943_at	ZFYVE26	0,62	1,05	1,14	1,12	1,02
217367_s_at	ZHX3	1,6	1,12	0,81	0,83	0,97
202172_at	ZNF161	1,85	1,25	0,83	0,68	1,23

Tab. II: P-Werte und GO-Analyse „transcription“ von U0126-behandelten HA1ER-Zellen

	AFFYID	SYMBOL	HA1ER	HA1ER U0
A GO1	200759_x_at	NFE2L1	7,23E-16	4,57E-02
<i>Transcription factor activity</i>	201170_s_at	BHLHB2	4,57E-15	1,06E-03
	201989_s_at	CREBL2	1,93E-15	3,34E-03
	202431_s_at	MYC	4,57E-15	2,25E-02
	202672_s_at	ATF3	3,59E-19	2,16E-09
	202963_at	RFX5	4,57E-15	2,10E-02
	203882_at	ISGF3G	1,63E-14	2,05E-02
	204020_at	PURA	4,57E-15	4,03E-03
	204082_at	PBX3	7,23E-16	8,48E-04
	204236_at	FLI1	4,57E-15	4,53E-02
	204341_at	TRIM16	4,57E-15	1,30E-04
	204420_at	FOSL1	1,93E-15	2,55E-02
	205372_at	PLAG1	4,57E-15	6,95E-04
	206018_at	FOXG1B	3,59E-19	4,72E-03
	210457_x_at	HMGA1	4,57E-15	5,13E-07
	208436_s_at	IRF7	3,59E-19	7,60E-03
	208763_s_at	TSC22D3	1,93E-15	1,55E-03
	211597_s_at	HOP	4,57E-15	1,59E-02
	212764_at	TCF8	2,48E-15	6,91E-05
	213147_at	HOXA10	4,57E-15	7,71E-03
	213293_s_at	TRIM22	1,93E-15	1,48E-07
	213435_at	SATB2	3,59E-19	1,13E-03
	217367_s_at	ZHX3	1,63E-14	9,04E-03
	221773_at	ELK3	1,63E-14	4,99E-04
	221884_at	EVI1	7,23E-16	4,36E-04
	221911_at	ETV1	7,28E-15	2,53E-04
	213462_at	NPAS2	1,63E-14	1,18E-07
	209969_s_at	STAT1	7,28E-15	1,57E-03
B GO2	202167_s_at	MMS19L	2,48E-15	1,87E-02
<i>transcription activator activity</i>	202337_at	PMF1	4,57E-15	4,62E-02
	202656_s_at	SERTAD2	4,57E-15	3,57E-02
	202935_s_at	SOX9	7,23E-16	4,10E-06
	202963_at	RFX5	4,57E-15	2,10E-02
	203496_s_at	PPARBP	3,59E-19	1,95E-02
	204420_at	FOSL1	1,93E-15	2,55E-02
	210457_x_at	HMGA1	4,57E-15	5,13E-07
	212764_at	TCF8	2,48E-15	6,91E-05
	212867_at	NCOA2	1,63E-14	2,20E-02
C GO3	200856_x_at	NCOR1	2,48E-15	7,66E-03
<i>transcription repression activity</i>	201170_s_at	BHLHB2	4,57E-15	1,06E-03
	201200_at	CREG1	2,48E-15	3,09E-02
	202266_at	TTRAP	7,23E-16	2,54E-02
	202672_s_at	ATF3	3,59E-19	2,16E-09
	204004_at	PAWR	4,57E-15	4,78E-02
	209272_at	NAB1	4,57E-15	4,27E-04
	212614_at	ARAFFYID5B	4,57E-15	1,94E-02
	212764_at	TCF8	2,48E-15	6,91E-05
	212867_at	NCOA2	1,63E-14	2,20E-02

213293_s_at	TRIM22	1,93E-15	1,48E-07
218574_s_at	LMCD1	7,28E-15	4,33E-04
221773_at	ELK3	1,63E-14	4,99E-04

Tab. III regulierte Gene nach SRF siRNA vermittelte Inhibition in HA1EB, P-Wert < 0,05

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
213266_at	76P	210327_s_at	AGXT	217014_s_at	AZGP1
219488_at	A4GALT	200849_s_at	AHCYL1	201882_x_at	B4GALT1
201000_at	AARS	201491_at	AHSA1	209413_at	B4GALT2
209165_at	AATF	219841_at	AICDA	206232_s_at	B4GALT6
213978_at	ABBA-1	205512_s_at	AIFM1	206233_at	B4GALT6
220159_at	ABCA11	208967_s_at	AK2	204874_x_at	BAIAP3
204343_at	ABCA3	212173_at	AK2	212081_x_at	BAT2
206317_s_at	ABCB8	213396_s_at	AKAP10	215437_x_at	BAZ2A
208480_s_at	ABCC6	215336_at	AKAP11	219487_at	BBS10
207622_s_at	ABCF2	207344_at	AKAP3	212745_s_at	BBS4
207623_at	ABCF2	203847_s_at	AKAP8	219107_at	BCAN
202394_s_at	ABCF3	215741_x_at	AKAP8L	203576_at	BCAT2
218633_x_at	ABHD10	203809_s_at	AKT2	207004_at	BCL2
205566_at	ABHD2	212609_s_at	AKT3	205681_at	BCL2A1
221679_s_at	ABHD6	205633_s_at	ALAS1	204907_s_at	BCL3
45288_at	ABHD6	207015_s_at	ALDH1A2	215990_s_at	BCL6
209028_s_at	ABI1	203722_at	ALDH4A1	219072_at	BCL7C
211793_s_at	ABI2	208950_s_at	ALDH7A1	217223_s_at	BCR
214274_s_at	ACAA1	202022_at	ALDOC	207432_at	BEST2
43427_at	ACACB	207396_s_at	ALG3	206956_at	BGLAP
205156_s_at	ACCN2	205621_at	ALKBH1	213905_x_at	BGN
200793_s_at	ACO2	217667_at	ALKBH3	201032_at	BLCAP
208002_s_at	ACOT7	220365_at	ALLC	202201_at	BLVRB
204242_s_at	ACOX3	207206_s_at	ALOX12	202701_at	BMP1
207427_at	ACR	214340_at	ALOX12P2	205574_x_at	BMP1
207969_x_at	ACRV1	211619_s_at	ALPP	206725_x_at	BMP1
201660_at	ACSL3	201197_at	AMD1	207595_s_at	BMP1
201661_s_at	ACSL3	218575_at	ANAPC1	59644_at	BMP2K
216409_at	ACSL6	205141_at	ANG	216514_at	BMP3
203872_at	ACTA1	213001_at	ANGPTL2	203082_at	BMS1L
206014_at	ACTL6B	208773_s_at	ANKHD1	209922_at	BRAP
208218_s_at	ACVR1B	213035_at	ANKRD28	204520_x_at	BRD1
202740_at	ACY1	213715_s_at	ANKRD47	208685_x_at	BRD2
217380_s_at	ADD3	215759_at	ANKRD53	202227_s_at	BRD8
209122_at	ADFP	201301_s_at	ANXA4	57540_at	BRE
217748_at	ADIPOR1	218261_at	AP1M2	215631_s_at	BRMS1
220980_s_at	ADPGK	203300_x_at	AP1S2	208906_at	BSCL2
201792_at	AEBP1	202120_x_at	AP2S1	208517_x_at	BTF3
219199_at	AFF4	208074_s_at	AP2S1	211939_x_at	BTF3
212283_at	AGRN	211047_x_at	AP2S1	205299_s_at	BTN2A2
212285_s_at	AGRN	215148_s_at	APBA3	204820_s_at	BTN3A3
217419_x_at	AGRN	201686_x_at	API5	204821_at	BTN3A3
204499_at	AGTPBP1	215386_at	AUTS2	38241_at	BTN3A3
222321_at	AGTR2	218631_at	AVPI1	204901_at	BTRC

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
216275_at	BUB1	208247_at	C3orf51	215049_x_at	CD163
219177_at	BXDC2	219717_at	C4orf30	207278_s_at	CD209
213410_at	C10orf137	203600_s_at	C4orf8	208651_x_at	CD24
218331_s_at	C10orf18	221823_at	C5orf30	209772_s_at	CD24
210455_at	C10orf28	218518_at	C5orf5	202256_at	CD2BP2
212423_at	C10orf56	213871_s_at	C6orf108	215856_at	CD33L3
212121_at	C10orf61	213314_at	C6orf162	206804_at	CD3G
220152_at	C10orf95	220755_s_at	C6orf48	35150_at	CD40
218213_s_at	C11orf10	219006_at	C6orf66	204490_s_at	CD44
219012_s_at	C11orf30	218008_at	C7orf42	209835_x_at	CD44
204218_at	C11orf51	221629_x_at	C8orf30A	212014_x_at	CD44
221534_at	C11orf68	220222_at	C8orf39	217523_at	CD44
209779_at	C12orf31	221946_at	C9orf116	206508_at	CD70
221067_s_at	C12orf39	204480_s_at	C9orf16	201725_at	CDC123
219022_at	C12orf43	41047_at	C9orf16	204695_at	CDC25A
221231_s_at	C14orf102	213900_at	C9orf61	201853_s_at	CDC25B
219164_s_at	C14orf103	205949_at	CA1	210474_s_at	CDC2L2
221434_s_at	C14orf156	208432_s_at	CACNA1E	215329_s_at	CDC2L2
218298_s_at	C14orf159	217515_s_at	CACNA1S	203377_s_at	CDC40
212499_s_at	C14orf32	34726_at	CACNB3	201130_s_at	CDH1
212992_at	C14orf78	221401_at	CACNG5	215608_at	CDH11
217898_at	C15orf24	215259_s_at	CADM4	210601_at	CDH6
215087_at	C15orf39	212077_at	CALD1	210518_at	CDH8
221265_s_at	C15orf44	207243_s_at	CALM2	203468_at	CDK10
220101_x_at	C17orf59	200622_x_at	CALM3	210622_x_at	CDK10
220178_at	C19orf28	216142_at	CALML4	220935_s_at	CDK5RAP2
219005_at	C19orf4	212952_at	CALR	213348_at	CDKN1C
222052_at	C19orf54	214316_x_at	CALR	207530_s_at	CDKN2B
212574_x_at	C19orf6	200755_s_at	CALU	215999_at	CDRT1
219283_at	C1GALT1C1	208095_s_at	CAMK2G	212862_at	CDS2
218712_at	C1orf109	213268_at	CAMTA1	206192_at	CDSN
219856_at	C1orf116	201850_at	CAPG	217291_at	CEACAM5
215899_at	C1orf121	37012_at	CAPZB	203757_s_at	CEACAM6
210652_s_at	C1orf34	220162_s_at	CARD9	203973_s_at	CEBPD
218456_at	C1QDC1	206837_at	CART1	214523_at	CEBPE
219463_at	C20orf103	216903_s_at	CBARA1	41660_at	CELSR1
206656_s_at	C20orf3	220018_at	CBLL1	204029_at	CELSR2
218089_at	C20orf4	209213_at	CBR1	219591_at	CEND1
219958_at	C20orf46	222137_at	CC2D1A	218148_at	CENPT
203993_x_at	C21orf2	218722_s_at	CCDC51	215882_at	CEP152
203995_at	C21orf2	218628_at	CCDC53	207971_s_at	CEP68
221975_s_at	C21orf2	203119_at	CCDC86	219531_at	CEP72
219004_s_at	C21orf45	219774_at	CCDC93	206824_at	CES4
218377_s_at	C21orf6	37425_g_at	CCHCR1	202357_s_at	CFB
220681_at	C22orf26	211174_s_at	CCKAR	213800_at	CFH
221984_s_at	C2orf17	216714_at	CCL13	214618_at	CFLAR
219137_s_at	C2orf33	216598_s_at	CCL2	206380_s_at	CFP
220172_at	C2orf37	201700_at	CCND3	218876_at	CGI-38
219662_at	C2orf49	208655_at	CCNI	212571_at	CHD8
208440_at	C3orf27	219470_x_at	CCNJ	210416_s_at	CHEK2
		200877_at	CCT4	218178_s_at	CHMP1B

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
212624_s_at	CHN1	203551_s_at	COX11	210764_s_at	CYR61
218566_s_at	CHORDC1	203663_s_at	COX5A	201095_at	DAP
211248_s_at	CHRD	206353_at	COX6A2	211214_s_at	DAPK1
221674_s_at	CHRD	217329_x_at	COX7BP1	201623_s_at	DARS
211039_at	CHRNA1	204172_at	CPOX	216038_x_at	DAXX
207568_at	CHRNA6	210069_at	CPT1B	208281_x_at	DAZ3
207859_s_at	CHRNA6	208488_s_at	CR1	222234_s_at	DBNDD1
205007_s_at	CIB2	209522_s_at	CRAT	40273_at	DBP
205008_s_at	CIB2	209432_s_at	CREB3	216725_at	DCAMKL2
213976_at	CIZ1	213498_at	CREB3L1	201894_s_at	DCN
200998_s_at	CKAP4	202551_s_at	CRIM1	218508_at	DCP1A
204810_s_at	CKM	202226_s_at	CRK	212690_at	DDHD2
38069_at	CLCN7	221139_s_at	CSAD	209383_at	DDIT3
208474_at	CLDN6	220445_s_at	CSAG2	201241_at	DDX1
206682_at	CLEC10A	208356_x_at	CSH1	202577_s_at	DDX19A
201769_at	CLINT1	203807_x_at	CSH2	200694_s_at	DDX24
212358_at	CLIP3	213086_s_at	CSNK1A1	200702_s_at	DDX24
204370_at	CLP1	213860_x_at	CSNK1A1	215693_x_at	DDX27
206131_at	CLPS	204459_at	CSTF2	219108_x_at	DDX27
219621_at	CLSPN	203947_at	CSTF3	40255_at	DDX28
219414_at	CLSTN2	212863_x_at	CTBP1	220890_s_at	DDX47
204375_at	CLSTN3	201218_at	CTBP2	210397_at	DEFB1
204577_s_at	CLUAP1	215377_at	CTBP2	212974_at	DENND3
207261_at	CNGA3	221021_s_at	CTNBL1	214027_x_at	DES
203951_at	CNN1	209617_s_at	CTNND2	204383_at	DGCR14
201605_x_at	CNN2	200661_at	CTSA	217275_at	DGCR14
203291_at	CNOT4	200838_at	CTSB	32032_at	DGCR14
210204_s_at	CNOT4	200839_s_at	CTSB	201790_s_at	DHCR7
210866_s_at	CNOT4	213274_s_at	CTSB	201791_s_at	DHCR7
205723_at	CNTFR	203657_s_at	CTSF	204801_s_at	DHRS12
215393_s_at	COBLL1	202087_s_at	CTSL1	201386_s_at	DHX15
203653_s_at	COIL	204113_at	CUGBP1	203694_s_at	DHX16
216993_s_at	COL11A2	209489_at	CUGBP1	218198_at	DHX32
211809_x_at	COL13A1	36084_at	CUL7	219350_s_at	DIABLO
216866_s_at	COL14A1	205242_at	CXCL13	204405_x_at	DIMT1L
217430_x_at	COL1A1	206974_at	CXCR6	217106_x_at	DIMT1L
217435_x_at	COL1A1	220252_x_at	CXorf21	201479_at	DKC1
217404_s_at	COL2A1	205238_at	CXorf34	216212_s_at	DKC1
214641_at	COL4A3	213315_x_at	CXorf40A	214570_x_at	DKFZP434P211
210945_at	COL4A6	221121_at	CXorf48	221596_s_at	DKFZP564O0523
213992_at	COL4A6	219805_at	CXorf56	204687_at	DKFZP564O0823
212938_at	COL6A1	203624_at	CXYorf3	220284_at	DKKL1
201438_at	COL6A3	201066_at	CYC1	206798_x_at	DLEC1
218072_at	COMMD9	216779_at	CYLC1	202515_at	DLG1
217516_x_at	COMT	213295_at	CYLD	215988_s_at	DLG1
201098_at	COPB2	207063_at	CYorf14	212730_at	DMN
201264_at	COPE	214622_at	CYP21A2	200881_s_at	DNAJA1
219997_s_at	COPS7B	205676_at	CYP27B1	205963_s_at	DNAJA3
212228_s_at	COQ9	217468_at	CYP2D6	215792_s_at	DNAJC11
221676_s_at	CORO1C	206539_s_at	CYP4F12	206781_at	DNAJC4
203858_s_at	COX10	201289_at	CYR61	205545_x_at	DNAJC8

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
210748_at	DNAJC8	201935_s_at	EIF4G3	212484_at	FAM89B
212491_s_at	DNAJC8	201936_s_at	EIF4G3	218689_at	FANCF
222154_s_at	DNAPTP6	213757_at	EIF5A	201910_at	FARP1
215116_s_at	DNM1	220198_s_at	EIF5A2	201911_s_at	FARP1
212838_at	DNMBP	207077_at	ELA2B	212218_s_at	FASN
220139_at	DNMT3L	201767_s_at	ELAC2	216395_at	FBXL18
222003_s_at	DOCK6	201510_at	ELF3	209943_at	FBXL4
209691_s_at	DOK4	210827_s_at	ELF3	219305_x_at	FBXO2
221677_s_at	DONSON	214445_at	ELL2	221157_s_at	FBXO24
222041_at	DPH1	219411_at	ELMO3	212991_at	FBXO9
204514_at	DPH2	221094_s_at	ELP3	204232_at	FCER1G
215433_at	DPY19L1	209233_at	EMG1	203240_at	FCGBP
203258_at	DRAP1	201808_s_at	ENG	213669_at	FCHO1
214559_at	DRD3	201809_s_at	ENG	205237_at	FCN1
202810_at	DRG1	220153_at	ENTPD7	201275_at	FDPS
204750_s_at	DSC2	213579_s_at	EP300	203646_at	FDX1
204751_x_at	DSC2	217050_at	EPAG	204767_s_at	FEN1
203405_at	DSCR2	215054_at	EPOR	206412_at	FER
214253_s_at	DTNB	221655_x_at	EPS8L1	202305_s_at	FEZ2
215501_s_at	DUSP10	213468_at	ERCC2	214589_at	FGF12
221563_at	DUSP10	38158_at	ESPL1	205782_at	FGF7
208201_at	DUX2	211234_x_at	ESR1	205014_at	FGFBP1
216473_x_at	DUX4	207726_at	ESRRB	203638_s_at	FGFR2
57532_at	DVL2	204034_at	ETHE1	211237_s_at	FGFR4
217976_s_at	DYNC1LI1	221911_at	ETV1	204135_at	FILIP1L
209033_s_at	DYRK1A	219432_at	EVC	221007_s_at	FIP1L1
202971_s_at	DYRK2	214042_s_at	EVI1	219249_s_at	FKBP10
210151_s_at	DYRK3	204774_at	EVI2A	219118_at	FKBP11
218660_at	DYSF	217838_s_at	EVL	31826_at	FKBP15
219990_at	E2F8	211825_s_at	EWSR1	76897_s_at	FKBP15
202735_at	EBP	212035_s_at	EXOC7	209931_s_at	FKBP1B
201749_at	ECE1	218695_at	EXOSC4	208255_s_at	FKBP8
201135_at	ECHS1	206329_at	EXTL1	40850_at	FKBP8
208883_at	EDD1	209692_at	EYA2	219187_at	FKBPL
218995_s_at	EDN1	204714_s_at	F5	218920_at	FLJ10404
209572_s_at	EED	208962_s_at	FADS1	218674_at	FLJ13611
204540_at	EEF1A2	208963_x_at	FADS1	220531_at	FLJ14126
204905_s_at	EEF1E1	208964_s_at	FADS1	52731_at	FLJ20294
215005_at	EFCBP2	202218_s_at	FADS2	48106_at	FLJ20489
206580_s_at	EFEMP2	204257_at	FADS3	220137_at	FLJ20674
202023_at	EFNA1	216080_s_at	FADS3	222274_at	FLJ31568
208112_x_at	EHD1	221602_s_at	FAIM3	213788_s_at	FLJ35348
222221_x_at	EHD1	221267_s_at	FAM108A1	212791_at	FLJ38984
205341_at	EHD2	221687_s_at	FAM125B	200859_x_at	FLNA
209429_x_at	EIF2B4	202916_s_at	FAM20B	213746_s_at	FLNA
201144_s_at	EIF2S1	212929_s_at	FAM21C	214752_x_at	FLNA
217363_x_at	EIF3S1	201863_at	FAM32A	55705_at	FMN2
200597_at	EIF3S10	202771_at	FAM38A	206496_at	FMO3
203462_x_at	EIF3S9	203206_at	FAM53B	215174_at	FMO6P
201530_x_at	EIF4A1	214822_at	FAM5B	202709_at	FMOD
211787_s_at	EIF4A1	45749_at	FAM65A	200090_at	FNTA

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
204420_at	FOSL1	207525_s_at	GIPC1	207642_at	HCRT
207653_at	FOXD2	216579_at	GJB4	203260_at	HDDC2
217032_at	FOXD4L1	214430_at	GLA	208055_s_at	HERC4
204131_s_at	FOXO3A	204836_at	GLDC	203395_s_at	HES1
220819_at	FRMD1	214730_s_at	GLG1	201944_at	HEXB
207204_at	FSCN2	206646_at	GLI1	202814_s_at	HEXIM1
203592_s_at	FSTL3	206662_at	GLRX	218839_at	HEY1
211628_x_at	FTHP1	221932_s_at	GLRX5	206086_x_at	HFE
214093_s_at	FUBP1	218473_s_at	GLT25D1	211863_x_at	HFE
200959_at	FUS	33646_g_at	GM2A	211866_x_at	HFE
217370_x_at	FUS	200780_x_at	GNAS	214307_at	HGD
201637_s_at	FXR1	200981_x_at	GNAS	220387_s_at	HHLA3
218084_x_at	FXYD5	211858_x_at	GNAS	216911_s_at	HIC2
204451_at	FZD1	214548_x_at	GNAS	59999_at	HIF1AN
218665_at	FZD4	207514_s_at	GNAT1	222123_s_at	HIF3A
202812_at	GAA	217850_at	GNL3	209559_at	HIP1R
211457_at	GABARAPL3	222149_x_at	GOLGA8G	214537_at	HIST1H1D
203146_s_at	GABBR1	206655_s_at	GP1BB	207982_at	HIST1H1T
205850_s_at	GABRB3	210848_at	GPI	215071_s_at	HIST1H2AC
205044_at	GABRP	221902_at	GPR153	209911_x_at	HIST1H2BD
207574_s_at	GADD45B	206971_at	GPR161	222067_x_at	HIST1H2BD
209304_x_at	GADD45B	205056_s_at	GPR162	208527_x_at	HIST1H2BE
209305_s_at	GADD45B	208556_at	GPR31	208546_x_at	HIST1H2BH
204121_at	GADD45G	216464_x_at	GPR44	209806_at	HIST1H2BK
207739_s_at	GAGE2	203632_s_at	GPRC5B	207611_at	HIST1H2BL
207663_x_at	GAGE3	206709_x_at	GPT	208575_at	HIST1H3A
205670_at	GAL3ST1	206204_at	GRB14	208180_s_at	HIST1H4H
201723_s_at	GALNT1	210412_at	GRIN2B	202708_s_at	HIST2H2BE
M33197_3_at	GAPDH	207036_x_at	GRIN2D	217034_at	HLA-C
M33197_M_at	GAPDH	211284_s_at	GRN	209823_x_at	HLA-DQB1
212804_s_at	GAPVD1	212432_at	GRPEL1	215193_x_at	HLA-DRB1
210005_at	GART	212434_at	GRPEL1	202983_at	HLTF
212379_at	GART	207929_at	GRPR	205822_s_at	HMGCS1
31874_at	GAS2L1	201470_at	GSTO1	221750_at	HMGCS1
207704_s_at	GAS7	202355_s_at	GTF2F1	221652_s_at	HMGN3
209602_s_at	GATA3	202356_s_at	GTF2F1	211930_at	HNRPA3P1
209604_s_at	GATA3	204366_s_at	GTF3C2	221480_at	HNRPD
210002_at	GATA6	218238_at	GTPBP4	214918_at	HNRPM
209093_s_at	GBA	211040_x_at	GTSE1	208766_s_at	HNRPR
210589_s_at	GBA	206062_at	GUCA1A	221639_x_at	HNRPU
218912_at	GCC1	201554_x_at	GYG1	217080_s_at	HOMER2
212241_at	Gcom1	204805_s_at	H1FX	204647_at	HOMER3
221577_x_at	GDF15	214412_at	H2AFB2	36030_at	HOM-TES-103
221136_at	GDF2	207168_s_at	H2AFY	214651_s_at	HOXA9
204472_at	GEM	208579_x_at	H2BFS	205600_x_at	HOXB5
206589_at	GFI1	215778_x_at	HAB1	204778_x_at	HOXB7
221028_s_at	GFOD2	202042_at	HARS	204779_s_at	HOXB7
205696_s_at	GFRA1	209252_at	HARS2	216973_s_at	HOXB7
205722_s_at	GFRA2	206432_at	HAS2	216417_x_at	HOXB9
209248_at	GHITM	209458_x_at	HBA1	214604_at	HOXD11
211767_at	GINS4	216383_at	hCG_2040224	205454_at	HPCA

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
212552_at	HPCAL1	216301_at	IGL@	218823_s_at	KCTD9
206024_at	HPD	211798_x_at	IGLJ3	207265_s_at	KDELR3
206820_at	HRBL	214677_x_at	IGLJ3	205284_at	KIAA0133
206863_x_at	HRK	207844_at	IL13	213006_at	KIAA0146
206865_at	HRK	206172_at	IL13RA2	200617_at	KIAA0152
205465_x_at	HS3ST1	221947_at	IL17RC	212733_at	KIAA0226
207882_at	HSAJ2425	205067_at	IL1B	212735_at	KIAA0226
206294_at	HSD3B2	222062_at	IL27RA	212441_at	KIAA0232
210977_s_at	HSF4	212411_at	IMP4	212475_at	KIAA0241
216450_x_at	HSP90B1	203126_at	IMPA2	209255_at	KIAA0265
202581_at	HSPA1B	203607_at	INPP5F	204307_at	KIAA0329
211538_s_at	HSPA2	206598_at	INS	213630_at	KIAA0363
200691_s_at	HSPA9	201626_at	INSIG1	212805_at	KIAA0367
220747_at	HSPC072	206502_s_at	INSM1	213304_at	KIAA0423
203023_at	HSPC111	218905_at	INTS8	204303_s_at	KIAA0427
214011_s_at	HSPC111	210114_at	INVS	212979_s_at	KIAA0738
217774_s_at	HSPC152	203546_at	IPO13	204568_at	KIAA0831
200806_s_at	HSPD1	200995_at	IPO7	212405_s_at	KIAA0859
200807_s_at	HSPD1	221185_s_at	IQCG	212505_s_at	KIAA0892
205133_s_at	HSPE1	202621_at	IRF3	217652_at	KIAA0892
201654_s_at	HSPG2	204057_at	IRF8	220911_s_at	KIAA1305
206976_s_at	HSPH1	209075_s_at	ISCU	211433_x_at	KIAA1539
220098_at	HYDIN	212766_s_at	ISG20L2	221843_s_at	KIAA1609
217900_at	IARS2	222240_s_at	ISYNA1	65438_at	KIAA1609
36564_at	IBRDC3	205032_at	ITGA2	215750_at	KIAA1659
201566_x_at	AFFYID2	201389_at	ITGA5	215943_at	KIAA1661
210046_s_at	AFFYIDH2	213475_s_at	ITGAL	214276_at	KLF12
201509_at	AFFYIDH3B	204989_s_at	ITGB4	204176_at	KLHL20
210014_x_at	AFFYIDH3B	204990_s_at	ITGB4	203068_at	KLHL21
210418_s_at	AFFYIDH3B	210213_s_at	ITGB4BP	213610_s_at	KLHL23
204615_x_at	AFFYIDI1	201124_at	ITGB5	221985_at	KLHL24
208881_x_at	AFFYIDI1	202662_s_at	ITPR2	205470_s_at	KLK11
213723_s_at	AFFYIDUA	201188_s_at	ITPR3	213573_at	KPNB1
218611_at	IER5	209099_x_at	JAG1	218303_x_at	KRCC1
206332_s_at	IFI16	216268_s_at	JAG1	203203_s_at	KRR1
208966_x_at	IFI16	32137_at	JAG2	210633_x_at	KRT10
202147_s_at	IFRD1	211109_at	JAK3	201596_x_at	KRT18
204792_s_at	IFT140	201547_at	JARAFFYID1B	214580_x_at	KRT5
203627_at	IGF1R	203298_s_at	JARAFFYID2	207669_at	KRT83
202410_x_at	IGF2	220278_at	JMJD2D	220970_s_at	KRTAP2-4
210881_s_at	IGF2	212723_at	JMJD6	213767_at	KSR1
216493_s_at	IGF2BP3	221580_s_at	JOSD3	204385_at	KYNU
203426_s_at	IGFBP5	202138_x_at	JTV1	204585_s_at	L1CAM
211958_at	IGFBP5	209971_x_at	JTV1	216081_at	LAMA4
211959_at	IGFBP5	200079_s_at	KARS	200771_at	LAMC1
211835_at	IGH@	200840_at	KARS	201552_at	LAMP1
211693_at	IGHA1	221307_at	KCNIP1	202019_s_at	LANCL1
216318_at	IGHA1	220540_at	KCNK15	200673_at	LAPTM4A
211649_x_at	IGHG1	220629_at	KCNQ1DN	211005_at	LAT
222285_at	IGHG1	207366_at	KCNS1	213717_at	LDB3
216491_x_at	IGHM	213474_at	KCTD7	221557_s_at	LEF1

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
209179_s_at	LENG4	212909_at	LYPD1	211111_at	MLLT4
218717_s_at	LEPREL1	218561_s_at	LYRM4	218211_s_at	MLPH
218939_at	LETM1	203094_at	MAD2L1BP	203435_s_at	MME
208333_at	LHX5	206750_at	MAFK	160020_at	MMP14
214045_at	LIAS	210092_at	MAGOH	208387_s_at	MMP24
202726_at	LIG1	204777_s_at	MAL	216863_s_at	MORC2
206856_at	LILRB5	217922_at	MAN1A2	219852_s_at	MORN1
57539_at	LIME1	214703_s_at	MAN2B2	221367_at	MOS
220765_s_at	LIMS2	221697_at	MAP1LC3C	209708_at	MOXD1
206124_s_at	LLGL1	202424_at	MAP2K2	209208_at	MPDU1
219775_s_at	LMAN1L	213490_s_at	MAP2K2	203740_at	MPHOSPH6
221274_s_at	LMAN2L	204756_at	MAP2K5	215731_s_at	MPHOSPH9
203276_at	LMNB1	209952_s_at	MAP2K7	209280_at	MRC2
214905_at	LOC145899	203901_at	MAP3K7IP1	37408_at	MRC2
215039_at	LOC339524	212567_s_at	MAP4	212199_at	MRFAP1L1
212857_x_at	LOC342346	33850_at	MAP4	217907_at	MRPL18
65472_at	LOC388969	216139_s_at	MAPK8IP3	211595_s_at	MRPS11
216808_at	LOC391703	203842_s_at	MAPRE3	204331_s_at	MRPS12
216196_at	LOC440366	218582_at	MARCH5	212604_at	MRPS31
213360_s_at	LOC441253	203942_s_at	MARK2	220688_s_at	MRT04
220341_s_at	LOC51149	207824_s_at	MAZ	217418_x_at	MS4A1
212114_at	LOC552889	212064_x_at	MAZ	221406_s_at	MSH5
220770_s_at	LOC63920	203353_s_at	MBD1	218733_at	MSL2L1
222361_at	LOC643224	220195_at	MBD5	218773_s_at	MSRB2
215610_at	LOC644974	35147_at	MCF2L	219451_at	MSRB2
215207_x_at	LOC729148	212246_at	MCFD2	205455_at	MST1R
222194_at	LOC729689	221354_s_at	MCHR1	213380_x_at	MSTP9
60794_f_at	LOC730051	200796_s_at	MCL1	202247_s_at	MTA1
222012_at	LOC90379	209036_s_at	MDH2	211783_s_at	MTA1
203570_at	LOXL1	209035_at	MDK	205322_s_at	MTF1
202460_s_at	LPIN2	212693_at	MDN1	203345_s_at	MTF2
202822_at	LPP	219348_at	MDS032	203346_s_at	MTF2
216250_s_at	LPXN	208434_at	MDS1	210242_x_at	MTHFS
221640_s_at	LRDD	209397_at	ME2	36920_at	MTM1
205953_at	LRIG2	218061_at	MEA1	222014_x_at	MTO1
204674_at	LRMP	210794_s_at	MEG3	203199_s_at	MTRR
200784_s_at	LRP1	213807_x_at	MET	203200_s_at	MTRR
220254_at	LRP12	203406_at	MFAP1	203037_s_at	MTSS1
211615_s_at	LRPPRC	211801_x_at	MFN1	210386_s_at	MTX1
218550_s_at	LRRC20	204153_s_at	MFNG	214898_x_at	MUC3B
212924_s_at	LSM4	215528_at	MGAT5	219796_s_at	MUCDHL
202903_at	LSM5	205740_s_at	MGC10433	220074_at	MUCDHL
202245_at	LSS	221757_at	MGC17330	203027_s_at	MVD
206975_at	LTA	218641_at	MGC3032	202180_s_at	MVP
208771_s_at	LTA4H	217700_at	MGC40499	221250_s_at	MXD3
204442_x_at	LTBP4	218376_s_at	MICAL1	219098_at	MYBBP1A
213176_s_at	LTBP4	221863_at	MIER2	201710_at	MYBL2
221832_s_at	LUZP1	204305_at	MIPEP	208208_at	MYH13
206584_at	LY96	207233_s_at	MITF	217545_at	MYH14
221554_at	LYK5	212748_at	MKL1	214468_at	MYH6
52169_at	LYK5	218071_s_at	MKRN2	211926_s_at	MYH9

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
201058_s_at	MYL9	216015_s_at	NLRP3	204003_s_at	NUPL2
221660_at	MYLC2PL	201577_at	NME1	207877_s_at	NVL
220319_s_at	MYLIP	222038_s_at	NME1	221967_at	NXPH4
219173_at	MYO15B	202237_at	NNMT	211166_at	NY-REN-7
219509_at	MYOZ1	202115_s_at	NOC2L	222324_at	OBSCN
221820_s_at	MYST1	218889_at	NOC3L	213946_s_at	OBSL1
211874_s_at	MYST4	214123_s_at	NOL14	200790_at	ODC1
204138_s_at	MZF1	215141_at	NOL14	219245_s_at	OGFOD2
204860_s_at	NAIP	200875_s_at	NOL5A	213075_at	OLFML2A
217884_at	NAT10	218199_s_at	NOL6	205306_x_at	OPN3
204823_at	NAV3	202882_x_at	NOL7	221445_at	OR1A2
201384_s_at	NBR1	210097_s_at	NOL7	216817_s_at	OR2H1
211685_s_at	NCALD	222080_s_at	NOL7	221426_s_at	OR3A3
211063_s_at	NCK1	219110_at	NOLA1	215770_at	OR7E2P
217088_s_at	NCR1	205895_s_at	NOLC1	210028_s_at	ORC3L
208759_at	NCSTN	211951_at	NOLC1	219105_x_at	ORC6L
202607_at	NDST1	217225_x_at	NOMO2	201799_s_at	OSBP
201304_at	NDUFA5	221853_s_at	NOMO3	217017_at	OSBPL10
218160_at	NDUFA8	217950_at	NOSIP	218304_s_at	OSBPL11
202077_at	NDUFAB1	210756_s_at	NOTCH2	210344_at	OSBPL7
204125_at	NDUFAF1	203238_s_at	NOTCH3	206605_at	P11
203371_s_at	NDUFB3	206476_s_at	NOVA2	221372_s_at	P2RX2
203613_s_at	NDUFB6	210808_s_at	NOX1	200654_at	P4HB
201740_at	NDUFS3	219773_at	NOX4	208676_s_at	PA2G4
201840_at	NEDD8	201695_s_at	NP	200815_s_at	PAFAH1B1
221801_x_at	NEFL	89476_r_at	NPEPL1	202336_s_at	PAM
205113_at	NEFM	213471_at	NPHP4	205060_at	PARG
211089_s_at	NEK3	221923_s_at	NPM1	214086_s_at	PARP2
208926_at	NEU1	206801_at	NPPB	207924_x_at	PAX8
204889_s_at	NEURL	208379_x_at	NPY2R	212151_at	PBX1
208497_x_at	NEUROG1	209120_at	NR2F2	211097_s_at	PBX2
207965_at	NEUROG3	201865_x_at	NR3C1	209361_s_at	PCBP4
211914_x_at	NF1	207978_s_at	NR4A3	213369_at	PCDH21
217150_s_at	NF2	208232_x_at	NRG1	211365_s_at	PCDHA2
218915_at	NF2	208241_at	NRG1	205202_at	PCMT1
208196_x_at	NFATC1	204081_at	NRGN	208857_s_at	PCMT1
210161_at	NFATC1	212298_at	NRP1	217816_s_at	PCNP
205897_at	NFATC4	209983_s_at	NRXN2	205549_at	PCP4
213033_s_at	NFIB	205795_at	NRXN3	208824_x_at	PCTK1
209807_s_at	NFIX	215020_at	NRXN3	206474_at	PCTK2
213794_s_at	NGDN	203269_at	NSMAF	212422_at	PDCD11
214497_s_at	NHLH2	219708_at	NT5M	203415_at	PDCD6
221836_s_at	NIBP	205134_s_at	NUFIP1	203708_at	PDE4B
218133_s_at	NIF3L1	214962_s_at	NUP160	211302_s_at	PDE4B
217896_s_at	NIP30	212247_at	NUP205	214130_s_at	PDE4DIP
205004_at	NKRF	222382_x_at	NUP205	216640_s_at	PDIA6
207451_at	NKX2-8	212316_at	NUP210	205960_at	PDK4
209706_at	NKX3-1	218622_at	NUP37	218690_at	PDLIM4
221366_at	NKX6-1	218295_s_at	NUP50	219307_at	PDSS2
218318_s_at	NLK	214935_at	NUP62	218018_at	PDXK
210113_s_at	NLRP1	202188_at	NUP93	219630_at	PDZK1IP1

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
211941_s_at	PEBP1	203622_s_at	PNO1	203103_s_at	PRPF19
218472_s_at	PELO	39854_r_at	PNPLA2	214380_at	PRPF31
218590_at	PEO1	209740_s_at	PNPLA4	203537_at	PRPSAP2
205251_at	PER2	219152_at	PODXL2	217794_at	PRR13
202212_at	PES1	212836_at	POLD3	47069_at	PRR5
205094_at	PEX12	212100_s_at	POLDIP3	217326_x_at	PRSS1
203970_s_at	PEX3	215357_s_at	POLDIP3	217328_at	PRSS1
210908_s_at	PFDN5	216026_s_at	POLE	213802_at	PRSS12
200634_at	PFN1	222238_s_at	POLM	209599_s_at	PRUNE
205736_at	PGAM2	207515_s_at	POLR1C	200866_s_at	PSAP
206288_at	PGGT1B	217415_at	POLR2A	211521_s_at	PSCD4
200919_at	PHC2	209511_at	POLR2F	215923_s_at	PSD4
40446_at	PHF1	218016_s_at	POLR3E	208257_x_at	PSG1
212660_at	PHF15	205218_at	POLR3F	213141_at	PSKH1
218517_at	PHF17	212178_s_at	POM121	201676_x_at	PSMA1
209423_s_at	PHF20	205720_at	POMC	210759_s_at	PSMA1
209439_s_at	PHKA2	218476_at	POMT1	211746_x_at	PSMA1
217998_at	PHLDA1	213449_at	POP1	201532_at	PSMA3
217999_s_at	PHLDA1	202868_s_at	POP4	203396_at	PSMA4
218000_s_at	PHLDA1	204839_at	POP5	201114_x_at	PSMA7
216019_x_at	PHLDB1	211660_at	POU2F2	214288_s_at	PSMB1
214609_at	PHOX2A	208563_x_at	POU3F3	200786_at	PSMB7
203691_at	PI3	214532_x_at	POU5F1P1	204219_s_at	PSMC1
203035_s_at	PIAS3	209529_at	PPAP2C	201068_s_at	PSMC2
213651_at	PIB5PA	37152_at	PPARD	209503_s_at	PSMC5
215832_x_at	PICALM	219066_at	PPCDC	208777_s_at	PSMD11
213889_at	PIGL	210236_at	PPFIA1	201232_s_at	PSMD13
221689_s_at	PIGP	200967_at	PPIB	200830_at	PSMD2
220041_at	PIGZ	203407_at	PPL	201388_at	PSMD3
217872_at	PIH1D1	212686_at	PPM1H	200882_s_at	PSMD4
204484_at	PIK3C2B	202014_at	PPP1R15A	210460_s_at	PSMD4
209193_at	PIM1	215628_x_at	PPP2CA	211609_x_at	PSMD4
214224_s_at	PIN4	202313_at	PPP2R2A	212220_at	PSME4
201251_at	PKM2	208874_x_at	PPP2R4	218371_s_at	PSPC1
209785_s_at	PLA2G4C	216105_x_at	PPP2R4	219938_s_at	PSTPIP2
205479_s_at	PLAU	209490_s_at	PPT2	219658_at	PTCD2
211668_s_at	PLAU	210499_s_at	PQBP1	211748_x_at	PTGDS
209643_s_at	PLD2	216001_at	PRAMEF12	212187_x_at	PTGDS
219024_at	PLEKHA1	219515_at	PRDM10	207650_x_at	PTGER1
212717_at	PLEKHM1	220894_x_at	PRDM12	211892_s_at	PTGIS
216200_at	PLEKHM1	218329_at	PRDM4	203110_at	PTK2B
202619_s_at	PLOD2	205628_at	PRIM2A	218045_x_at	PTMS
202620_s_at	PLOD2	202801_at	PRKACA	212029_s_at	PTOV1
214781_at	PLXNA1	213093_at	PRKCA	204960_at	PTPRCAP
221538_s_at	PLXNA1	211380_s_at	PRKG1	200635_s_at	PTPRF
215807_s_at	PLXNB1	218378_s_at	PRKRIP1	200636_s_at	PTPRF
221022_s_at	PMFBP1	206358_at	PRM1	200637_s_at	PTPRF
212088_at	PMPCA	217786_at	PRMT5	215066_at	PTPRF
210707_x_at	PMS2L11	215707_s_at	PRNP	208790_s_at	PTRF
216525_x_at	PMS2L3	220568_at	PRO1483	218732_at	PTRH2
209597_s_at	PNMA2	208004_at	PROL1	213806_at	PURA

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
214444_s_at	PVR	204339_s_at	RGS4	213694_at	RSBN1
209336_at	PWP2	211448_s_at	RGS6	212302_at	RTF1
201481_s_at	PYGB	219554_at	RHCG	204198_s_at	RUNX3
202990_at	PYGL	210586_x_at	RHD	217538_at	RUTBC1
209174_s_at	QRICH1	201451_x_at	RHEB	215519_x_at	RUTBC3
200863_s_at	RAB11A	206454_s_at	RHO	201614_s_at	RUUBL1
34478_at	RAB11B	212651_at	RHOBTB1	205954_at	RXRG
216043_x_at	RAB11FIP3	216184_s_at	RIMS1	212438_at	RY1
221810_at	RAB15	206137_at	RIMS2	202598_at	S100A13
59697_at	RAB15	218598_at	RINT1	208607_s_at	SAA2
218360_at	RAB22A	218535_s_at	RIOK2	214456_x_at	SAA2
220955_x_at	RAB23	209544_at	RIPK2	208740_at	SAP18
208730_x_at	RAB2A	221215_s_at	RIPK4	208741_at	SAP18
204214_s_at	RAB32	211514_at	RIPK5	218254_s_at	SAR1B
208466_at	RAB3D	219056_at	RNASEH2B	200069_at	SART3
213530_at	RAB3GAP1	212724_at	RND3	41644_at	SASH1
203150_at	RABEPK	220788_s_at	RNF31	215760_s_at	SBNO2
218785_s_at	RABL5	219035_s_at	RNF34	218206_x_at	SCAND1
207405_s_at	RAD17	212696_s_at	RNF4	222211_x_at	SCAND2
210826_x_at	RAD17	206845_s_at	RNF40	203889_at	SCG5
201222_s_at	RAD23B	211849_s_at	RNGTT	206147_x_at	SCML2
216529_at	RAD50	218993_at	RNMTL1	210363_s_at	SCN2B
209965_s_at	RAD51L3	208270_s_at	RNPEP	207049_at	SCN8A
211318_s_at	RAE1	213813_x_at	RNPS1	217264_s_at	SCNN1A
202100_at	RALB	205578_at	ROR2	208458_at	SCNN1D
202101_s_at	RALB	206419_at	RORC	205241_at	SCO2
202845_s_at	RALBP1	212370_x_at	RP11-56A21.1	212154_at	SDC2
204916_at	RAMP1	214946_x_at	RP11-56A21.1	212158_at	SDC2
53987_at	RANBP10	218441_s_at	RPAP1	202898_at	SDC3
208272_at	RANBP3	216589_at	RPL10	207707_s_at	SEC13
214103_s_at	RAP2A	221726_at	RPL22	216642_at	SEC14L1
201330_at	RARS	200013_at	RPL24	218703_at	SEC22A
205169_at	RBBP5	200823_x_at	RPL29	201582_at	SEC23B
219222_at	RBKS	213969_x_at	RPL29	216392_s_at	SEC23IP
221929_at	RBM12B	211666_x_at	RPL3	202798_at	SEC24B
218134_s_at	RBM22	215208_x_at	RPL35A	203484_at	SEC61G
218593_at	RBM28	219762_s_at	RPL36	219259_at	SEMA4A
201394_s_at	RBM5	201492_s_at	RPL41	219039_at	SEMA4C
208307_at	RBM1A1	200763_s_at	RPLP1	208100_x_at	SEMA6C
218599_at	REC8L1	200909_s_at	RPLP2	214790_at	SENP6
213520_at	RECQL4	208689_s_at	RPN2	216147_at	SEPT11
210309_at	RECQL5	203436_at	RPP30	210657_s_at	SEPT4
204364_s_at	REEP1	200031_s_at	RPS11	208657_s_at	SEPT9
209752_at	REG1A	213350_at	RPS11	210466_s_at	SERBP1
202297_s_at	RER1	214245_at	RPS14	221471_at	SERINC3
200940_s_at	REER	201049_s_at	RPS18	213874_at	SERPINA4
203225_s_at	RFK	201094_at	RPS29	204614_at	SERPINB2
218723_s_at	RGC32	214089_at	RPS8	204855_at	SERPINB5
209639_s_at	RGS12	216902_s_at	RRN3	216811_at	SERPINB9
204337_at	RGS4	216913_s_at	RRP12	212190_at	SERPINE2
204338_s_at	RGS4	209567_at	RRS1	205352_at	SERPINI1

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
219382_at	SERTAD3	205918_at	SLC4A3	219257_s_at	SPHK1
210231_x_at	SET	202219_at	SLC6A8	215503_at	SPINT3
213153_at	SETD1B	213843_x_at	SLC6A8	204640_s_at	SPOP
200619_at	SF3B2	217248_s_at	SLC7A8	214549_x_at	SPRR1A
214016_s_at	SFPQ	207053_at	SLC8A1	208539_x_at	SPRR2D
203380_x_at	SFRS5	208039_at	SLC9A2	212558_at	SPRY1
202774_s_at	SFRS8	207308_at	SLCO1A2	219677_at	SPSB1
202775_s_at	SFRS8	222071_s_at	SLCO4C1	205155_s_at	SPTBN2
214387_x_at	SFTPC	209897_s_at	SLIT2	217995_at	SQRDL
216076_at	SGK2	203875_at	SMARCA1	213112_s_at	SQSTM1
201851_at	SH3GL1	206406_at	SMCP	201248_s_at	SREBF2
205637_s_at	SH3GL3	217171_at	SMPD1	202400_s_at	SRF
218813_s_at	SH3GLB2	209427_at	SMTN	201858_s_at	SRGN
213308_at	SHANK2	218393_s_at	SMU1	201859_at	SRGN
217304_at	SHMT1	218685_s_at	SMUG1	202199_s_at	SRPK1
219083_at	SHQ1	219480_at	SNAI1	203181_x_at	SRPK2
221705_s_at	SIKE	202507_s_at	SNAP25	201224_s_at	SRRM1
206558_at	SIM2	202508_s_at	SNAP25	207435_s_at	SRRM2
39705_at	SIN3B	204001_at	SNAPC3	207893_at	SRY
202254_at	SIPA1L1	213203_at	SNAPC5	217051_s_at	SS18
202897_at	SIRPA	217616_at	SNF1LK	213140_s_at	SS18L1
221010_s_at	SIRT5	215011_at	SNHG3	202591_s_at	SSBP1
204361_s_at	SKAP2	206055_s_at	SNRPA1	202506_at	SSFA2
215137_at	SKI	202505_at	SNRPB2	219919_s_at	SSH3
200718_s_at	SKP1A	201342_at	SNRPC	51192_at	SSH3
217473_x_at	SLC11A1	203316_s_at	SNRPE	214556_at	SSTR4
207567_at	SLC13A2	203832_at	SNRPF	203759_at	ST3GAL4
207074_s_at	SLC18A1	205644_s_at	SNRPG	208064_s_at	ST8SIA3
207150_at	SLC18A3	215424_s_at	SNW1	215044_s_at	STAM2
209775_x_at	SLC19A1	200991_s_at	SNX17	202811_at	STAMPB
202800_at	SLC1A3	206360_s_at	SOCS3	204597_x_at	STC1
201920_at	SLC20A1	214105_at	SOCS3	203438_at	STC2
220100_at	SLC22A11	200642_at	SOD1	204292_x_at	STK11
206097_at	SLC22A18AS	215078_at	SOD2	208855_s_at	STK24
220554_at	SLC22A7	209253_at	SORBS3	217714_x_at	STMN1
221662_s_at	SLC22A7	201562_s_at	SORD	204729_s_at	STX1A
219090_at	SLC24A3	212797_at	SORT1	216985_s_at	STX3
203340_s_at	SLC25A12	212807_s_at	SORT1	212800_at	STX6
218725_at	SLC25A22	208574_at	SOX14	219389_at	SUSD4
201918_at	SLC25A36	206122_at	SOX15	218619_s_at	SUV39H1
212833_at	SLC25A46	217040_x_at	SOX15	209024_s_at	SYNCRIP
212085_at	SLC25A6	219568_x_at	SOX18	217832_at	SYNCRIP
212826_s_at	SLC25A6	213722_at	SOX2	217834_s_at	SYNCRIP
207249_s_at	SLC28A2	213665_at	SOX4	201079_at	SYNGR2
204717_s_at	SLC29A2	207777_s_at	SP140	212990_at	SYNJ1
221262_s_at	SLC2A11	212470_at	SPAG9	202796_at	SYNPO
207035_at	SLC30A3	207724_s_at	SPAST	209358_at	TAF11
203306_s_at	SLC35A1	217927_at	SPCS1	206613_s_at	TAF1A
213119_at	SLC36A1	201240_s_at	SPCS2	213090_s_at	TAF4
219215_s_at	SLC39A4	214403_x_at	SPDEF	210053_at	TAF5
200924_s_at	SLC3A2	214404_x_at	SPDEF	205547_s_at	TAGLN

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
204878_s_at	TAOK2	210130_s_at	TM7SF2	203610_s_at	TRIM38
208428_at	TAP2	220240_s_at	TMCO3	217760_at	TRIM44
200020_at	TARDBP	216998_s_at	TMDCII	58308_at	TRIM62
219443_at	TASP1	208184_s_at	TMEM1	209011_at	TRIO
203648_at	TATDN2	203437_at	TMEM11	201546_at	TRIP12
213787_s_at	TBC1D25	218897_at	TMEM177	203701_s_at	TRMT1
215640_at	TBC1D2B	204676_at	TMEM186	210463_x_at	TRMT1
202495_at	TBCC	219569_s_at	TMEM22	219299_at	TRMT12
201759_at	TBCD	202857_at	TMEM4	211700_s_at	TRO
211052_s_at	TBCD	217795_s_at	TMEM43	212839_s_at	TROVE2
222356_at	TBL1Y	204807_at	TMEM5	217287_s_at	TRPC6
219682_s_at	TBX3	218815_s_at	TMEM51	220226_at	TRPM8
215122_at	TBX6	218562_s_at	TMEM57	208104_s_at	TSC22D4
211276_at	TCEAL2	65630_at	TMEM80	219581_at	TSEN2
202818_s_at	TCEB3	218790_s_at	TMLHE	201758_at	TSG101
210515_at	TCF1	206769_at	TMSB4Y	220544_at	TSKS
209151_x_at	TCF3	201645_at	TNC	203226_s_at	TSPAN31
216645_at	TCF3	202510_s_at	TNFAIP2	218012_at	TSPYL2
212382_at	TCF4	210405_x_at	TNFRSF10B	212928_at	TSPYL4
205513_at	TCN1	207641_at	TNFRSF13B	201434_at	TTC1
203742_s_at	TDG	214581_x_at	TNFRSF21	218972_at	TTC17
214600_at	TEAD1	206467_x_at	TNFRSF6B	215106_at	TTC22
203611_at	TERF2	48531_at	TNIP2	219758_at	TTC26
205486_at	TESK2	206393_at	TNNI2	210129_s_at	TTLL3
209215_at	TETRA	221506_s_at	TNPO2	214983_at	TTY15
214063_s_at	TF	212317_at	TNPO3	209251_x_at	TUBA1C
204147_s_at	TFDP1	212883_at	TOMM40	212242_at	TUBA4A
202750_s_at	TFIP11	201519_at	TOMM70A	214876_s_at	TUBGCP5
209277_at	TFPI2	203050_at	TP53BP1	203273_s_at	TUSC2
218996_at	TFPT	203421_at	TP53I11	209228_x_at	TUSC3
203084_at	TGFB1	201379_s_at	TPD52L2	221253_s_at	TXNDC5
209908_s_at	TGFB2	206116_s_at	TPM1	201588_at	TXNL1
209909_s_at	TGFB2	210987_x_at	TPM1	209080_x_at	TXNL2
220407_s_at	TGFB2	209344_at	TPM4	218794_s_at	TXNL4B
54632_at	THADA	200743_s_at	TPP1	217684_at	TYMS
204776_at	THBS4	219030_at	TPRKB	204122_at	TYROBP
35846_at	THRA	209670_at	TRA@	218347_at	TYW1
219477_s_at	THSD1	213443_at	TRADD	221839_s_at	UBAP2
218491_s_at	THYN1	202837_at	TRAFD1	200633_at	UBB
201446_s_at	TIA1	35254_at	TRAFD1	208980_s_at	UBC
206409_at	TIAM1	219748_at	TREML2	211296_x_at	UBC
218118_s_at	TIMM23	202479_s_at	TRIB2	200964_at	UBE1
201666_at	TIMP1	204732_s_at	TRIM23	201898_s_at	UBE2A
212665_at	TIPARP	210994_x_at	TRIM23	211764_s_at	UBE2D1
47608_at	TJAP1	210995_s_at	TRIM23	217824_at	UBE2J1
202338_at	TK1	204390_at	TRIM24	200682_s_at	UBE2L3
203222_s_at	TLE1	212116_at	TRIM27	217393_x_at	UBE2NL
210379_s_at	TLK1	211002_s_at	TRIM29	216315_x_at	UBE2V1
220832_at	TLR8	210159_s_at	TRIM31	212278_x_at	UBE3A
209386_at	TM4SF1	215444_s_at	TRIM31	209088_s_at	UBN1
209387_s_at	TM4SF1	203567_s_at	TRIM38	217100_s_at	UBXD7

AffyID	Symbol	AffyID	Symbol	AffyID	Symbol
208997_s_at	UCP2	218107_at	WDR26	205714_s_at	ZMYND10
220775_s_at	UEVLD	219297_at	WDR44	209049_s_at	ZMYND8
218801_at	UGCGL2	56919_at	WDR48	221842_s_at	ZNF131
220746_s_at	UIMC1	218505_at	WDR59	207402_at	ZNF132
215154_at	ULK2	218957_s_at	WDR71	204474_at	ZNF142
202707_at	UMPS	213031_s_at	WDR73	217242_at	ZNF154
203271_s_at	UNC119	201420_s_at	WDR77	204327_s_at	ZNF202
203583_at	UNC50	201421_s_at	WDR77	206416_at	ZNF205
212144_at	UNC84B	216036_x_at	WDTC1	220847_x_at	ZNF221
208971_at	UROD	202908_at	WFS1	219595_at	ZNF26
209136_s_at	USP10	216006_at	WIPF2	203707_at	ZNF263
209137_s_at	USP10	204710_s_at	WIPI2	204937_s_at	ZNF274
208723_at	USP11	207612_at	WNT8B	212892_at	ZNF282
201671_x_at	USP14	206067_s_at	WT1	211678_s_at	ZNF313
201672_s_at	USP14	216074_x_at	WWC1	203521_s_at	ZNF318
217829_s_at	USP39	220057_at	XAGE1	219376_at	ZNF322A
202681_at	USP4	218753_at	XKR8	221890_at	ZNF335
203991_s_at	UTX	220020_at	XPNPEP3	219224_x_at	ZNF408
218169_at	VAC14	205072_s_at	XRCC4	209944_at	ZNF410
213326_at	VAMP1	221939_at	YIPF2	219826_at	ZNF419
214115_at	VAMP5	65086_at	YIPF2	205964_at	ZNF426
208648_at	VCP	206063_x_at	YPEL1	219848_s_at	ZNF432
211403_x_at	VCX2	213996_at	YPEL1	207304_at	ZNF45
217140_s_at	VDAC1P	218647_s_at	YRDC	214746_s_at	ZNF467
204253_s_at	VDR	200639_s_at	YWHAZ	41113_at	ZNF500
204254_s_at	VDR	218263_s_at	ZBED5	206053_at	ZNF510
204255_s_at	VDR	205883_at	ZBTB16	220709_at	ZNF556
209946_at	VEGFC	214482_at	ZBTB25	220444_at	ZNF557
214004_s_at	VGLL4	206098_at	ZBTB6	212620_at	ZNF609
205946_at	VIPR2	205877_s_at	ZC3H7B	206188_at	ZNF623
203292_s_at	VPS11	220104_at	ZC3HAV1	219047_s_at	ZNF668
213686_at	VPS13A	216706_x_at	ZCWPW2	205089_at	ZNF7
201807_at	VPS26A	216871_at	ZDHC17	205881_at	ZNF74
212156_at	VPS39	210875_s_at	ZEB1	222120_at	ZNF764
203856_at	VRK1	211962_s_at	ZFP36L1	219627_at	ZNF767
218022_at	VRK3	201857_at	ZFR	204453_at	ZNF84
221998_s_at	VRK3	213286_at	ZFR	215461_at	ZNRF4
221124_s_at	VSX1	213073_at	ZFYVE26	207021_at	ZPBP
212264_s_at	WAPAL	213625_at	ZKSCAN4	213876_x_at	ZRSR2
200628_s_at	WARS	203730_s_at	ZKSCAN5	219904_at	ZSCAN5
218512_at	WDR12	219877_at	ZMAT4	215706_x_at	ZYX
220917_s_at	WDR19	54970_at	ZMIZ2		

Tab. IV: regulierte Gene nach FRA1 siRNA vermittelte Inhibition in HA1EB, P-Wert < 0,05

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
213266_at	76P	202394_s_at	ABCF3	217161_x_at	ACAN
201511_at	AAMP	218581_at	ABHD4	209608_s_at	ACAT2
209165_at	AATF	218405_at	ABT1	200793_s_at	ACO2
215873_x_at	ABCC10	202025_x_at	ACAA1	208002_s_at	ACOT7
208480_s_at	ABCC6	212186_at	ACACA	207427_at	ACR

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
207973_x_at	ACRV1	221522_at	ANKRD27	207508_at	ATP5G3
201660_at	ACSL3	213035_at	ANKRD28	202961_s_at	ATP5J2
201661_s_at	ACSL3	218274_s_at	ANKZF1	207573_x_at	ATP5L
201662_s_at	ACSL3	202888_s_at	ANPEP	208746_x_at	ATP5L
216409_at	ACSL6	201301_s_at	ANXA4	210453_x_at	ATP5L
203872_at	ACTA1	207064_s_at	AOC2	206993_at	ATP5S
220501_at	ACTL7A	201613_s_at	AP1G2	207809_s_at	ATP6AP1
220498_at	ACTL7B	65517_at	AP1M2	212383_at	ATP6V0A1
208637_x_at	ACTN1	202120_x_at	AP2S1	217603_at	ATP6V0A2
211160_x_at	ACTN1	208074_s_at	AP2S1	200078_s_at	ATP6V0B
219623_at	ACTR5	211047_x_at	AP2S1	200954_at	ATP6V0C
213790_at	ADAM12	206592_s_at	AP3D1	201089_at	ATP6V1B2
207665_at	ADAM21	215148_s_at	APBA3	208638_at	ATP6V1C2
222162_s_at	ADAMTS1	219465_at	APOA2	201527_at	ATP6V1F
214454_at	ADAMTS2	203382_s_at	APOE	208737_at	ATP6V1G1
201034_at	ADD3	219716_at	APOL6	221504_s_at	ATP6V1H
209122_at	ADFP	210068_s_at	AQP4	219659_at	ATP8A2
217748_at	ADIPOR1	200065_s_at	ARF1	212062_at	ATP9A
210961_s_at	ADRA1D	203311_s_at	ARF6	211852_s_at	ATRN
204183_s_at	ADRBK2	203312_x_at	ARF6	213745_at	ATRN1
206105_at	AFF2	218076_s_at	ARHGAP17	208859_s_at	ATRX
204694_at	AFP	212738_at	ARHGAP19	203231_s_at	ATXN1
210326_at	AGXT	37577_at	ARHGAP19	214742_at	AZI1
200849_s_at	AHCYL1	201167_x_at	ARHGDIA	219521_at	B3GAT1
211986_at	AHNAK	211716_x_at	ARHGDIA	203188_at	B3GNT1
205512_s_at	AIFM1	201288_at	ARHGDIB	212876_at	B4GALT4
201782_s_at	AIP	217348_x_at	ARHGEF15	221484_at	B4GALT5
208967_s_at	AK2	213039_at	ARHGEF18	221485_at	B4GALT5
212173_at	AK2	201228_s_at	ARIH2	206232_s_at	B4GALT6
201675_at	AKAP1	201229_s_at	ARIH2	217911_s_at	BAG3
201272_at	AKR1B1	202092_s_at	ARL2BP	204966_at	BAI2
207163_s_at	AKT1	217580_x_at	ARL6IP2	205294_at	BAIAP2
212607_at	AKT3	221758_at	ARMC6	203728_at	BAK1
212609_s_at	AKT3	203404_at	ARMCX2	210125_s_at	BANF1
205633_s_at	ALAS1	211575_s_at	ARPC2	219966_x_at	BANP
201952_at	ALCAM	220966_x_at	ARPC5L	201419_at	BAP1
215798_at	ALDH1L1	222046_at	ARS2	210208_x_at	BAT3
201612_at	ALDH9A1	200058_s_at	ASCC3L1	200837_at	BCAP31
214687_x_at	ALDOA	216000_at	ASNS	218264_at	BCCIP
204705_x_at	ALDOB	218857_s_at	ASRGL1	210347_s_at	BCL11A
202022_at	ALDOC	204903_x_at	ATG4B	203796_s_at	BCL7A
207396_s_at	ALG3	210858_x_at	ATM	207510_at	BDKRB1
218203_at	ALG5	40489_at	ATN1	204741_at	BICD1
205621_at	ALKBH1	214256_at	ATP10A	202094_at	BIRC5
214425_at	AMBP	205410_s_at	ATP2B4	202095_s_at	BIRC5
204976_s_at	AMMECR1	212135_s_at	ATP2B4	203773_x_at	BLVRA
36865_at	ANGEL1	212136_at	ATP2B4	207595_s_at	BMP1
205609_at	ANGPT1	205711_x_at	ATP5C1	59644_at	BMP2K
213001_at	ANGPTL2	208870_x_at	ATP5C1	220272_at	BNC2
209442_x_at	ANK3	213366_x_at	ATP5C1	204520_x_at	BRD1
219081_at	ANKHD1	208764_s_at	ATP5G2	215460_x_at	BRD1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
208685_x_at	BRD2	219004_s_at	C21orf45	206724_at	CBX4
220059_at	BRDG1	221211_s_at	C21orf7	209715_at	CBX5
215677_s_at	BRF1	220941_s_at	C21orf91	202047_s_at	CBX6
218955_at	BRF2	220681_at	C22orf26	202048_s_at	CBX6
66053_at	BSCL2	217118_s_at	C22orf9	221822_at	CCDC101
201236_s_at	BTG2	210175_at	C2orf3	213065_at	CCDC131
203944_x_at	BTN2A1	222193_at	C2orf43	209479_at	CCDC28A
211256_x_at	BTN2A1	219662_at	C2orf49	203119_at	CCDC86
204901_at	BTRC	221533_at	C3orf28	204335_at	CCDC94
212423_at	C10orf56	208247_at	C3orf51	37425_g_at	CCHCR1
220152_at	C10orf95	209285_s_at	C3orf63	205392_s_at	CCL14
218213_s_at	C11orf10	203600_s_at	C4orf8	210072_at	CCL19
209779_at	C12orf31	215974_at	C6orf12	216598_s_at	CCL2
219022_at	C12orf43	213314_at	C6orf162	200952_s_at	CCND2
218867_s_at	C12orf49	219006_at	C6orf66	201700_at	CCND3
219086_at	C14orf131	215380_s_at	C7orf24	221427_s_at	CCNL2
210532_s_at	C14orf2	218008_at	C7orf42	200910_at	CCT3
217898_at	C15orf24	220222_at	C8orf39	200877_at	CCT4
204494_s_at	C15orf39	221946_at	C9orf116	210436_at	CCT8
215087_at	C15orf39	47530_at	C9orf156	206206_at	CD180
221001_at	C15orf49	220660_at	C9orf27	205831_at	CD2
210672_s_at	C16orf35	218904_s_at	C9orf40	38521_at	CD22
213105_s_at	C16orf42	220505_at	C9orf53	202256_at	CD2BP2
219453_at	C16orf44	219147_s_at	C9orf95	218529_at	CD320
212736_at	C16orf45	210770_s_at	CACNA1A	215856_at	CD33L3
220743_at	C16orf72	208432_s_at	CACNA1E	206804_at	CD3G
217957_at	C16orf80	217515_s_at	CACNA1S	205153_s_at	CD40
209092_s_at	C17orf25	221585_at	CACNG4	211893_x_at	CD6
219435_at	C17orf68	209030_s_at	CADM1	205685_at	CD86
221739_at	C19orf10	209031_at	CADM1	202878_s_at	CD93
221316_at	C19orf15	209032_s_at	CADM1	202910_s_at	CD97
217926_at	C19orf53	215259_s_at	CADM4	205627_at	CDA
200056_s_at	C1D	210817_s_at	CALCOCO2	201853_s_at	CDC25B
218712_at	C1orf109	201615_x_at	CALD1	215159_s_at	CDC2L2
220193_at	C1orf113	209563_x_at	CALM1	212540_at	CDC34
212004_at	C1orf144	200622_x_at	CALM3	203794_at	CDC42BPA
219337_at	C1orf159	200623_s_at	CALM3	204510_at	CDC7
222000_at	C1orf174	216143_at	CALML4	218399_s_at	CDCA4
222281_s_at	C1orf186	221879_at	CALML4	221520_s_at	CDCA8
215556_at	C1orf63	200757_s_at	CALU	210622_x_at	CDK10
217087_at	C1orf68	212712_at	CAMSAP1	207188_at	CDK3
203429_s_at	C1orf9	213798_s_at	CAP1	220935_s_at	CDK5RAP2
218448_at	C20orf11	206837_at	CART1	218740_s_at	CDK5RAP3
218159_at	C20orf116	211208_s_at	CASK	213182_x_at	CDKN1C
220426_at	C20orf195	61297_at	CASKIN2	213348_at	CDKN1C
218586_at	C20orf20	210708_x_at	CASP10	216894_x_at	CDKN1C
217835_x_at	C20orf24	209811_at	CASP2	219534_x_at	CDKN1C
218089_at	C20orf4	211464_x_at	CASP6	207530_s_at	CDKN2B
217737_x_at	C20orf43	201432_at	CAT	209714_s_at	CDKN3
222044_at	C20orf67	203323_at	CAV2	212862_at	CDS2
221975_s_at	C21orf2	207625_s_at	CBFA2T2	214907_at	CEACAM21

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
214353_at	CELSR1	221676_s_at	CORO1C	211070_x_at	DBI
205046_at	CENPE	203858_s_at	COX10	218508_at	DCP1A
215882_at	CEP152	202343_x_at	COX5B	211780_x_at	DCTN1
219531_at	CEP72	211025_x_at	COX5B	218013_x_at	DCTN4
211927_x_at	CHCHD3	213735_s_at	COX5B	202262_x_at	DDAH2
208806_at	CHD3	201441_at	COX6B1	214909_s_at	DDAH2
208807_s_at	CHD3	201754_at	COX6C	215537_x_at	DDAH2
219356_s_at	CHMP5	217329_x_at	COX7BP1	212690_at	DDHD2
202175_at	CHPF	201119_s_at	COX8A	222134_at	DDO
221674_s_at	CHRD	211062_s_at	CPZ	200694_s_at	DDX24
207568_at	CHRNA6	220522_at	CRB1	200702_s_at	DDX24
209834_at	CHST3	211897_s_at	CRHR1	215693_x_at	DDX27
32094_at	CHST3	202551_s_at	CRIM1	220890_s_at	DDX47
201953_at	CIB1	221541_at	CRISPLD2	31807_at	DDX49
219398_at	CIDEC	202226_s_at	CRK	212834_at	DDX52
200998_s_at	CKAP4	205474_at	CRLF3	217754_at	DDX56
205295_at	CKMT2	51176_at	CRSP8	220732_at	DEPDC2
206207_at	CLC	207159_x_at	CRTC1	218858_at	DEPDC6
213628_at	CLCC1	218648_at	CRTC3	204383_at	DGCR14
206908_s_at	CLDN11	220445_s_at	CSAG2	32032_at	DGCR14
220332_at	CLDN16	210229_s_at	CSF2	209549_s_at	DGUOK
206682_at	CLEC10A	206475_x_at	CSH1	201790_s_at	DHCR7
205131_x_at	CLEC11A	202329_at	CSK	201791_s_at	DHCR7
207995_s_at	CLEC4M	213860_x_at	CSNK1A1	203694_s_at	DHX16
208659_at	CLIC1	207030_s_at	CSRP2	212674_s_at	DHX30
212358_at	CLIP3	211126_s_at	CSRP2	203334_at	DHX8
219621_at	CLSPN	201201_at	CSTB	219350_s_at	DIABLO
204050_s_at	CLTA	219309_at	CTA-216E10.6	213213_at	DIDO1
208791_at	CLU	203392_s_at	CTBP1	221191_at	DKFZ434A0131
208792_s_at	CLU	212863_x_at	CTBP1	217219_at	DKFZ434A062
203951_at	CNN1	202613_at	CTPS	214570_x_at	DKFZ434P211
203239_s_at	CNOT3	200838_at	CTSB	221595_at	DKFZ564O0523
203291_at	CNOT4	200839_s_at	CTSB	204687_at	DKFZ564O0823
210866_s_at	CNOT4	202087_s_at	CTSL1	204602_at	DKK1
208912_s_at	CNP	210074_at	CTSL2	202514_at	DLG1
211203_s_at	CNTN1	204113_at	CUGBP1	202515_at	DLG1
215393_s_at	COBLL1	209489_at	CUGBP1	212730_at	DMN
204320_at	COL11A1	203917_at	CXADR	215266_at	DNAH3
211809_x_at	COL13A1	206336_at	CXCL6	205963_s_at	DNAJA3
202310_s_at	COL1A1	212961_x_at	CXorf40B	200666_s_at	DNAJB1
217430_x_at	COL1A1	201885_s_at	CYB5R3	207453_s_at	DNAJB5
214641_at	COL4A3	213295_at	CYLD	212817_at	DNAJB5
212938_at	COL6A1	207063_at	CYorf14	202843_at	DNAJB9
204136_at	COL7A1	203979_at	CYP27A1	215792_s_at	DNAJC11
217312_s_at	COL7A1	206754_s_at	CYP2B6	205545_x_at	DNAJC8
214587_at	COL8A1	201278_at	DAB2	215116_s_at	DNM1
221900_at	COL8A2	205417_s_at	DAG1	218457_s_at	DNMT3A
206073_at	COLQ	201095_at	DAP	222003_s_at	DOCK6
218072_at	COMMD9	208281_x_at	DAZ3	221817_at	DOLPP1
213500_at	COPB2	202428_x_at	DBI	201430_s_at	DPYSL3
201264_at	COPE	209389_x_at	DBI	201431_s_at	DPYSL3

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
214559_at	DRD3	204513_s_at	ELMO1	211307_s_at	FCAR
202810_at	DRG1	221094_s_at	ELP3	221239_s_at	FCRL2
203635_at	DSCR3	203442_x_at	EML3	201275_at	FDPS
200606_at	DSP	217820_s_at	ENAH	203646_at	FDX1
212253_x_at	DST	201809_s_at	ENG	203562_at	FEZ1
212254_s_at	DST	204142_at	ENOSF1	219901_at	FGD6
215016_x_at	DST	206191_at	ENTPD3	214589_at	FGF12
201022_s_at	DSTN	201704_at	ENTPD6	204421_s_at	FGF2
208430_s_at	DTNA	220153_at	ENTPD7	221166_at	FGF23
203367_at	DUSP14	213579_s_at	EP300	206783_at	FGF4
201536_at	DUSP3	216437_at	EPC1	208417_at	FGF6
204015_s_at	DUSP4	215804_at	EPHA1	205782_at	FGF7
208201_at	DUX2	203499_at	EPHA2	205014_at	FGFBP1
203230_at	DVL1	209588_at	EPHB2	203638_s_at	FGFR2
205348_s_at	DYNC1I1	209589_s_at	EPHB2	208234_x_at	FGFR2
203590_at	DYNC1LI2	211165_x_at	EPHB2	203033_x_at	FH
200703_at	DYNLL1	216836_s_at	ERBB2	204135_at	FILIP1L
217917_s_at	DYNLRB1	214053_at	ERBB4	31826_at	FKBP15
203303_at	DYNLT3	202441_at	ERLIN1	76897_s_at	FKBP15
210151_s_at	DYRK3	207726_at	ESRRB	209931_s_at	FKBP1B
218660_at	DYSF	201573_s_at	ETF1	216787_at	FKBP1B
207232_s_at	DZIP3	222262_s_at	ETNK1	218003_s_at	FKBP3
204947_at	E2F1	203348_s_at	ETV5	204236_at	FLI1
215356_at	ECAT8	214042_s_at	EVI1	212024_x_at	FLI1
201749_at	ECE1	217838_s_at	EVL	220219_s_at	FLJ10120
201750_s_at	ECE1	212630_at	EXOC3	218894_s_at	FLJ10292
201135_at	ECHS1	216117_at	EXOSC2	220326_s_at	FLJ10357
209058_at	EDF1	212627_s_at	EXOSC7	218824_at	FLJ10781
209572_s_at	EED	209692_at	EYA2	219525_at	FLJ10847
204540_at	EEF1A2	203989_x_at	F2R	219943_s_at	FLJ11850
203113_s_at	EEF1D	204713_s_at	F5	220531_at	FLJ14126
214394_x_at	EEF1D	208962_s_at	FADS1	218532_s_at	FLJ20152
219833_s_at	EFHC1	208963_x_at	FADS1	218480_at	FLJ21839
202023_at	EFNA1	208964_s_at	FADS1	213788_s_at	FLJ35348
208469_s_at	EGFL8	221687_s_at	FAM125B	214752_x_at	FLNA
201693_s_at	EGR1	201863_at	FAM32A	206263_at	FMO4
201694_s_at	EGR1	218023_s_at	FAM53C	202709_at	FMOD
207767_s_at	EGR4	218029_at	FAM65A	214701_s_at	FN1
205341_at	EHD2	45749_at	FAM65A	216442_x_at	FN1
211956_s_at	EIF1	216044_x_at	FAM69A	213940_s_at	FNBP1
200597_at	EIF3S10	212218_s_at	FASN	217483_at	FOLH1
217719_at	EIF3S6IP	203184_at	FBN2	209189_at	FOS
201530_x_at	EIF4A1	209696_at	FBP1	207653_at	FOXO2
211787_s_at	EIF4A1	220127_s_at	FBXL12	206018_at	FOXG1B
208625_s_at	EIF4G1	219305_x_at	FBXO2	203064_s_at	FOXK2
201935_s_at	EIF4G3	221157_s_at	FBXO24	214148_at	FOXO1
220198_s_at	EIF5A2	44040_at	FBXO41	204131_s_at	FOXO3A
201510_at	ELF3	221812_at	FBXO42	220819_at	FRMD1
203617_x_at	ELK1	221813_at	FBXO42	212548_s_at	FRYL
204096_s_at	ELL	210638_s_at	FBXO9	219170_at	FSD1
214445_at	ELL2	212991_at	FBXO9	203592_s_at	FSTL3

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
211628_x_at	FTHP1	208556_at	GPR31	207156_at	HIST1H2AG
212788_x_at	FTL	206582_s_at	GPR56	209911_x_at	HIST1H2BD
218356_at	FTSJ2	203632_s_at	GPRC5B	222067_x_at	HIST1H2BD
212847_at	FUBP1	203646_at	FDX1	208527_x_at	HIST1H2BE
214093_s_at	FUBP1	206204_at	GRB14	208490_x_at	HIST1H2BF
214088_s_at	FUT3	215075_s_at	GRB2	208546_x_at	HIST1H2BH
211465_x_at	FUT6	214018_at	GRIP1	209806_at	HIST1H2BK
202419_at	FVT1	212432_at	GRPEL1	208575_at	HIST1H3A
203172_at	FXR2	212434_at	GRPEL1	208180_s_at	HIST1H4H
202275_at	G6PD	207929_at	GRPR	214290_s_at	HIST2H2AA3
203146_s_at	GABBR1	220430_at	GRRP1	218280_x_at	HIST2H2AA3
209305_s_at	GADD45B	215438_x_at	GSPT1	202708_s_at	HIST2H2BE
218313_s_at	GALNT7	202678_at	GTF2A2	200697_at	HK1
33579_i_at	GALR3	202356_s_at	GTF2F1	202934_at	HK2
/M33197_3_at	GAPDH	210891_s_at	GTF2I	211643_x_at	HLA-C
207116_s_at	GAPDHS	213835_x_at	GTPBP3	201137_s_at	HLA-DPB1
212804_s_at	GAPVD1	218239_s_at	GTPBP4	215193_x_at	HLA-DRB1
214869_x_at	GAPVD1	204315_s_at	GTSE1	208306_x_at	HLA-DRB4
212379_at	GART	211040_x_at	GTSE1	200680_x_at	HMGCB1
204457_s_at	GAS1	206062_at	GUCA1A	205822_s_at	HMGCS1
209729_at	GAS2L1	211555_s_at	GUCY1B3	221750_at	HMGCS1
31874_at	GAS2L1	200075_s_at	GUK1	202579_x_at	HMGNA4
218131_s_at	GATAD2A	207168_s_at	H2AFY	218120_s_at	HMOX2
212241_at	Gcom1	208579_x_at	H2BFS	216559_x_at	HNRPA1
203539_s_at	GFAP	208755_x_at	H3F3A	211929_at	HNRPA3P1
203540_at	GFAP	213828_x_at	H3F3A	211930_at	HNRPA3P1
214005_at	GGCX	209069_s_at	H3F3B	200014_s_at	HNRPC
208284_x_at	GGT1	206010_at	HABP2	212626_x_at	HNRPC
211417_x_at	GGT1	208630_at	HADHA	213359_at	HNRPD
206885_x_at	GH1	202042_at	HARS	201993_x_at	HNRPDL
209248_at	GHITM	206432_at	HAS2	212454_x_at	HNRPDL
211767_at	GIN54	219484_at	HCFC2	221639_x_at	HNRPU
201667_at	GJA1	208287_at	HCG9	204647_at	HOMER3
221415_s_at	GJA10	207642_at	HCRT	209844_at	HOXB13
206921_at	GLE1L	204225_at	HDAC4	206739_at	HOXC5
205280_at	GLRB	203260_at	HDDC2	205975_s_at	HOXD1
209727_at	GM2A	218621_at	HEMK1	212552_at	HPCAL1
35820_at	GM2A	219863_at	HERC5	219052_at	HPS6
219920_s_at	GMPPB	203395_s_at	HES1	222126_at	HRBL
204248_at	GNA11	44783_s_at	HEY1	206865_at	HRK
214679_x_at	GNA11	206086_x_at	HFE	206997_s_at	HS6ST1
40562_at	GNA11	211866_x_at	HFE	207882_at	HSAJ2425
564_at	GNA11	214307_at	HGD	201413_at	HSD17B4
214548_x_at	GNAS	203711_s_at	HIBCH	220081_x_at	HSD17B7
207157_s_at	GNG5	212964_at	HIC2	207020_at	HSF2BP
214227_at	GNG7	212966_at	HIC2	221771_s_at	HSMPP8
210328_at	GNMT	59999_at	HIF1AN	200799_at	HSPA1A
201056_at	GOLGB1	222123_s_at	HIF3A	208814_at	HSPA4
218873_at	GON4L	213833_x_at	HIGD2A	208687_x_at	HSPA8
213207_s_at	GOSR2	202347_s_at	HIP2	220747_at	HSPC072
221902_at	GPR153	215071_s_at	HIST1H2AC	203023_at	HSPC111

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
214011_s_at	HSPC111	202662_s_at	ITPR2	214276_at	KLF12
217774_s_at	HSPC152	35776_at	ITSN1	221841_s_at	KLF4
208598_s_at	HUWE1	209099_x_at	JAG1	212882_at	KLHL18
220098_at	HYDIN	216268_s_at	JAG1	203068_at	KLHL21
36564_at	IBRDC3	220278_at	JMJD2D	221837_at	KLHL22
213450_s_at	ICOSLG	212723_at	JMJD6	213741_s_at	KPNA1
210046_s_at	IDH2	210434_x_at	JTB	211762_s_at	KPNA2
210014_x_at	IDH3B	202138_x_at	JTV1	213574_s_at	KPNB1
210418_s_at	IDH3B	209971_x_at	JTV1	213803_at	KPNB1
204615_x_at	IDI1	214326_x_at	JUND	201596_x_at	KRT18
208881_x_at	IDI1	205635_at	KALRN	207908_at	KRT2
202081_at	IER2	200079_s_at	KARS	207787_at	KRT33B
208966_x_at	IFI16	200840_at	KARS	214580_x_at	KRT5
201422_at	IFI30	221413_at	KCNAB3	215189_at	KRT86
204415_at	IFI6	211451_s_at	KCNJ4	204385_at	KYNU
219209_at	IFIH1	219615_s_at	KCNK5	204585_s_at	L1CAM
203153_at	IFIT1	221584_s_at	KCNMA1	219061_s_at	LAGE3
214022_s_at	IFITM1	206231_at	KCNN1	210644_s_at	LAIR1
207964_x_at	IFNA4	211217_s_at	KCNQ1	202020_s_at	LANCL1
208259_x_at	IFNA7	212564_at	KCTD2	212714_at	LARP4
202410_x_at	IGF2	34858_at	KCTD2	214215_s_at	LARP5
211835_at	IGH@	219479_at	KDELC1	218651_s_at	LARP6
211649_x_at	IGHG1	205284_at	KIAA0133	217810_x_at	LARS
217378_x_at	IGV1OR2108	212837_at	KIAA0157	203451_at	LDB1
216301_at	IGL@	200851_s_at	KIAA0174	35160_at	LDB1
221658_s_at	IL21R	212846_at	KIAA0179	213717_at	LDB3
222062_at	IL27RA	34221_at	KIAA0194	202726_at	LIG1
207094_at	IL8RA	203169_at	KIAA0258	206856_at	LILRB5
218516_s_at	IMPAD1	209255_at	KIAA0265	57539_at	LIME1
201892_s_at	IMPDH2	213242_x_at	KIAA0284	217475_s_at	LIMK2
204465_s_at	INA	202128_at	KIAA0317	221274_s_at	LMAN2L
209808_x_at	ING1	212356_at	KIAA0323	218574_s_at	LMCD1
202794_at	INPP1	213630_at	KIAA0363	203411_s_at	LMNA
201625_s_at	INSIG1	213300_at	KIAA0404	212086_x_at	LMNA
221818_at	INTS5	204303_s_at	KIAA0427	222039_at	LOC146909
210114_at	INVS	213340_s_at	KIAA0495	213248_at	LOC221362
213785_at	IPO9	212979_s_at	KIAA0738	214682_at	LOC339047
203907_s_at	IQSEC1	212981_s_at	KIAA0738	215039_at	LOC339524
209075_s_at	ISCU	212314_at	KIAA0746	212857_x_at	LOC342346
205483_s_at	ISG15	212505_s_at	KIAA0892	217314_at	LOC390688
203882_at	ISGF3G	216927_at	KIAA0892	213360_s_at	LOC441253
206104_at	ISL1	213316_at	KIAA1462	221108_at	LOC51233
201389_at	ITGA5	221843_s_at	KIAA1609	215610_at	LOC644974
209663_s_at	ITGA7	65438_at	KIAA1609	211456_x_at	LOC645745
216331_at	ITGA7	215681_at	KIAA1654	214355_x_at	LOC728377
202351_at	ITGAV	220008_at	KIAA2002	215207_x_at	LOC729148
221051_s_at	ITGB1BP3	209408_at	KIF2C	213367_at	LOC791120
49679_s_at	ITGB4BP	218355_at	KIF4A	221849_s_at	LOC90379
78047_s_at	ITGB4BP	211687_x_at	KIR3DL1	203570_at	LOXL1
208083_s_at	ITGB6	220825_s_at	KIRREL	202997_s_at	LOXL2
216944_s_at	ITPR1	205051_s_at	KIT	212274_at	LPIN1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
212276_at	LPIN1	203353_s_at	MBD1	218538_s_at	MRS2L
211596_s_at	LRIG1	214396_s_at	MBD2	217418_x_at	MS4A1
205953_at	LRIG2	213132_s_at	MCAT	210410_s_at	MSH5
200784_s_at	LRP1	212269_s_at	MCM3AP	212913_at	MSH5
205381_at	LRRC17	215581_s_at	MCM3AP	219451_at	MSRB2
218550_s_at	LRRC20	203061_s_at	MDC1	216320_x_at	MST1
212904_at	LRRC47	209036_s_at	MDH2	205455_at	MST1R
222068_s_at	LRRC50	212693_at	MDN1	213380_x_at	MSTP9
212532_s_at	LSM12	203004_s_at	MEF2D	212859_x_at	MT1E
202903_at	LSM5	210794_s_at	MEG3	217165_x_at	MT1F
205036_at	LSM6	207480_s_at	MEIS2	206461_x_at	MT1H
202245_at	LSS	211913_s_at	MERTK	216336_x_at	MT1M
211018_at	LSS	209265_s_at	METTL3	217546_at	MT1M
208771_s_at	LTA4H	203406_at	MFAP1	208581_x_at	MT1X
204442_x_at	LTBP4	201155_s_at	MFN2	212185_x_at	MT2A
213176_s_at	LTBP4	216205_s_at	MFN2	202247_s_at	MTA1
221832_s_at	LUZP1	215528_at	MGAT5	221619_s_at	MTCH1
218729_at	LXN	221949_at	MGC13098	217071_s_at	MTHFR
52169_at	LYK5	221756_at	MGC17330	213278_at	MTMR9
204458_at	LYPLA3	221757_at	MGC17330	203774_at	MTR
208633_s_at	MACF1	220698_at	MGC4294	203027_s_at	MVD
203094_at	MAD2L1BP	202365_at	MGC5139	202086_at	MX1
204970_s_at	MAFG	221477_s_at	MGC5618	201710_at	MYBL2
206750_at	MAFK	200899_s_at	MGEA5	206372_at	MYF6
215372_x_at	MAGI1	213710_s_at	MGP	212372_at	MYH10
209373_at	MALL	212576_at	MGRN1	208208_at	MYH13
202360_at	MAML1	205904_at	MICA	214468_at	MYH6
217922_at	MAN1A2	218376_s_at	MICAL1	211926_s_at	MYH9
218636_s_at	MAN1B1	203636_at	MID1	202555_s_at	MYLK
209166_s_at	MAN2B1	221862_at	MIER2	219173_at	MYO15B
220945_x_at	MANSC1	221863_at	MIER2	212364_at	MYO1B
203151_at	MAP1A	44822_s_at	MIER2	208189_s_at	MYO7A
221697_at	MAP1LC3C	214246_x_at	MINK1	33197_at	MYO7A
207667_s_at	MAP2K3	218071_s_at	MKRN2	219320_at	MYOHD1
215499_at	MAP2K3	218211_s_at	MLPH	204139_x_at	MZF1
205448_s_at	MAP3K12	217910_x_at	MLX	210336_x_at	MZF1
206249_at	MAP3K13	202519_at	MLXIP	204528_s_at	NAP1L1
212567_s_at	MAP4	208387_s_at	MMP24	210289_at	NAT8
203553_s_at	MAP4K5	203956_at	MORC2	201517_at	NCBP2
210058_at	MAPK13	216863_s_at	MORC2	213766_x_at	NCLN
210059_s_at	MAPK13	209708_at	MOXD1	215857_at	NCLN
216139_s_at	MAPK8IP3	215731_s_at	MPHOSPH9	217095_x_at	NCR1
202788_at	MAPKAPK3	219648_at	MREG	217045_x_at	NCR2
200713_s_at	MAPRE1	217907_at	MRPL18	208093_s_at	NDEL1
218582_at	MARCH5	220526_s_at	MRPL20	206453_s_at	NDRG2
200644_at	MARCKSL1	218339_at	MRPL22	209159_s_at	NDRG4
203942_s_at	MARK2	204599_s_at	MRPL28	202607_at	NDST1
209329_x_at	MASP1	203781_at	MRPL33	208334_at	NDST4
202350_s_at	MATN2	221692_s_at	MRPL34	202298_at	NDUFA1
209331_s_at	MAX	203800_s_at	MRPS14	218563_at	NDUFA3
209332_s_at	MAX	212604_at	MRPS31	218160_at	NDUFA8

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
202077_at	NDUFAB1	204081_at	NRGN	214528_s_at	PAX8
204125_at	NDUFAF1	210842_at	NRP2	221990_at	PAX8
218226_s_at	NDUFB4	219367_s_at	NRP2	207838_x_at	PBXIP1
203613_s_at	NDUFB6	205795_at	NRXN3	213369_at	PCDH21
201227_s_at	NDUFB8	221606_s_at	NSBP1	211365_s_at	PCDHA2
203478_at	NDUFC1	219708_at	NT5M	211876_x_at	PCDHGA11
218101_s_at	NDUFC2	201270_x_at	NUDCD3	211879_x_at	PCDHGA3
201966_at	NDUFS2	212247_at	NUP205	205717_x_at	PCDHGC3
203606_at	NDUFS6	222382_x_at	NUP205	210022_at	PCGF1
203961_at	NEBL	218622_at	NUP37	210023_s_at	PCGF1
220731_s_at	NECAP2	218294_s_at	NUP50	202231_at	PCID1
201840_at	NEDD8	202153_s_at	NUP62	202232_s_at	PCID1
205113_at	NEFM	221991_at	NXPH3	205202_at	PCMT1
214075_at	NENF	221967_at	NXPH4	213159_at	PCNX
218407_x_at	NENF	205552_s_at	OAS1	219295_s_at	PCOLCE2
208926_at	NEU1	204972_at	OAS2	201933_at	PCOLN3
204889_s_at	NEURL	205660_at	OASL	204210_s_at	PCYT1A
211914_x_at	NF1	200077_s_at	OAZ1	209577_at	PCYT2
208196_x_at	NFATC1	222075_s_at	OAZ3	202730_s_at	PDCD4
213029_at	NFIB	213946_s_at	OBSL1	204735_at	PDE4A
213033_s_at	NFIB	219277_s_at	OGDHL	203708_at	PDE4B
213028_at	NFRKB	205301_s_at	OGG1	212390_at	PDE4DIP
213794_s_at	NGDN	213075_at	OLFML2A	205463_s_at	PDGFA
220742_s_at	NGLY1	212213_x_at	OPA1	208658_at	PDIA4
201077_s_at	NHP2L1	216287_at	OPA1	211564_s_at	PDLIM4
218133_s_at	NIF3L1	206564_at	OPRL1	218691_s_at	PDLIM4
216015_s_at	NLRP3	222290_at	OR2A9P	221898_at	PDPN
219680_at	NLRX1	208573_s_at	OR2H2	219630_at	PDZK1IP1
201577_at	NME1	208507_at	OR7C2	216130_at	PDZRN3
222038_s_at	NME1	219105_x_at	ORC6L	205353_s_at	PEBP1
219324_at	NOL12	201799_s_at	OSBP	211941_s_at	PEBP1
215141_at	NOL14	217017_at	OSBPL10	212092_at	PEG10
200875_s_at	NOL5A	210344_at	OSBPL7	212094_at	PEG10
218199_s_at	NOL6	210448_s_at	P2RX5	36829_at	PER1
219110_at	NOLA1	208373_s_at	P2RY6	202212_at	PES1
217962_at	NOLA3	208676_s_at	PA2G4	205094_at	PEX12
217225_x_at	NOMO2	216422_at	PA2G4	203503_s_at	PEX14
221853_s_at	NOMO3	200815_s_at	PAFAH1B1	202258_s_at	PFAAP5
217950_at	NOSIP	214124_x_at	PAIP2	201507_at	PFDN1
210756_s_at	NOTCH2	203154_s_at	PAK4	205362_s_at	PFDN4
203238_s_at	NOTCH3	210335_at	PAMCI	207132_x_at	PFDN5
206476_s_at	NOVA2	218771_at	PANK4	210908_s_at	PFDN5
219773_at	NOX4	218947_s_at	PAPD1	200634_at	PFN1
201695_s_at	NP	215418_at	PARVA	200886_s_at	PGAM1
200701_at	NPC2	204005_s_at	PAWR	217356_s_at	PGK1
217041_at	NPTXR	121_at	PAX8	200919_at	PHC2
208379_x_at	NPY2R	207921_x_at	PAX8	218517_at	PHF17
206645_s_at	NR0B1	207923_x_at	PAX8	209439_s_at	PHKA2
202340_x_at	NR4A1	207924_x_at	PAX8	203709_at	PHKG2
208230_s_at	NRG1	209552_at	PAX8	209803_s_at	PHLDA2
208241_at	NRG1	213917_at	PAX8	217872_at	PIH1D1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
203879_at	PIK3CD	206174_s_at	PPP6C	202958_at	PTPN9
206138_s_at	PIK4CB	203737_s_at	PPRC1	214043_at	PTPRD
204269_at	PIM2	209490_s_at	PPT2	221840_at	PTPRE
206509_at	PIP	218208_at	PQLC1	200635_s_at	PTPRF
212518_at	PIP5K1C	211531_x_at	PRB1	200636_s_at	PTPRF
202522_at	PITPNB	201494_at	PRCP	200637_s_at	PTPRF
219155_at	PITPNC1	219835_at	PRDM8	211320_s_at	PTPRU
217421_at	PIWIL2	215067_x_at	PRDX2	204020_at	PURA
216949_s_at	PKD1	39729_at	PRDX2	218670_at	PUS1
210451_at	PKLR	201923_at	PRDX4	212662_at	PVR
219095_at	PLA2G4B	213093_at	PRKCA	203149_at	PVRL2
219014_at	PLAC8	209685_s_at	PRKCB1	212012_at	PXDN
210845_s_at	PLAUR	206270_at	PRKCG	212013_at	PXDN
211924_s_at	PLAUR	206099_at	PRKCH	202148_s_at	PYCR1
203895_at	PLCB4	213518_at	PRKCI	202990_at	PYGL
203896_s_at	PLCB4	208694_at	PRKDC	215520_at	PYGO1
202619_s_at	PLOD2	210543_s_at	PRKDC	209174_s_at	QRICH1
202185_at	PLOD3	218378_s_at	PRKRIP1	200863_s_at	RAB11A
207374_at	PLSCR2	206358_at	PRM1	210879_s_at	RAB11FIP5
215807_s_at	PLXNB1	217786_at	PRMT5	202252_at	RAB13
221022_s_at	PMFBP1	219408_at	PRMT7	221810_at	RAB15
212088_at	PMPCA	215707_s_at	PRNP	218931_at	RAB17
214473_x_at	PMS2L3	208004_at	PROL1	213440_at	RAB1A
216525_x_at	PMS2L3	202251_at	PRPF3	220955_x_at	RAB23
203622_s_at	PNO1	208880_s_at	PRPF6	219562_at	RAB26
217779_s_at	PNRC2	209440_at	PRPS1	50965_at	RAB26
201578_at	PODXL	47069_at	PRR5	208466_at	RAB3D
204835_at	POLA1	220433_at	PRRG3	213531_s_at	RAB3GAP1
202996_at	POLD4	205869_at	PRSS1	209089_at	RAB5A
212100_s_at	POLDIP3	209586_s_at	PRUNE	77508_r_at	RABEP2
207515_s_at	POLR1C	210988_s_at	PRUNE	203150_at	RABEPK
208996_s_at	POLR2C	205602_x_at	PSG7	205024_s_at	RAD51
209511_at	POLR2F	205961_s_at	PSIP1	37793_r_at	RAD51L3
218866_s_at	POLR3K	209337_at	PSIP1	211318_s_at	RAE1
212178_s_at	POM121	201676_x_at	PSMA1	201244_s_at	RAF1
202868_s_at	POP4	210759_s_at	PSMA1	202052_s_at	RAI14
209482_at	POP7	211746_x_at	PSMA1	202101_s_at	RALB
208563_x_at	POU3F3	201114_x_at	PSMA7	204916_at	RAMP1
214532_x_at	POU5F1P1	200039_s_at	PSMB2	202640_s_at	RANBP3
210265_x_at	POU6F1	208799_at	PSMB5	214487_s_at	RAP2B
206547_s_at	PPEF1	200786_at	PSMB7	203749_s_at	RARA
215280_s_at	PPFIA3	200820_at	PSMD8	217020_at	RARB
204517_at	PPIC	207805_s_at	PSMD9	206636_at	RASA2
204228_at	PPIH	209334_s_at	PSMD9	205801_s_at	RASGRP3
202014_at	PPP1R15A	211270_x_at	PTBP1	204346_s_at	RASSF1
207830_s_at	PPP1R8	216306_x_at	PTBP1	208242_at	RAX
200695_at	PPP2R1A	219658_at	PTCD2	219214_s_at	RBAK
202313_at	PPP2R2A	204054_at	PTEN	205169_at	RBBP5
207749_s_at	PPP2R3A	203555_at	PTPN18	221827_at	RBCK1
222288_at	PPP4R2	203997_at	PTPN3	218134_s_at	RBM22
203529_at	PPP6C	206687_s_at	PTPN6	219816_s_at	RBM23

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
203423_at	RBP1	217753_s_at	RPS26	207707_s_at	SEC13
211974_x_at	RBPJ	201094_at	RPS29	202082_s_at	SEC14L1
217775_s_at	RDH11	204906_at	RPS6KA2	202798_at	SEC24B
218599_at	REC8L1	212912_at	RPS6KA2	203484_at	SEC61G
205407_at	RECK	214317_x_at	RPS9	206049_at	SELP
210309_at	RECQL5	221940_at	RPUSD2	35666_at	SEMA3F
218777_at	REEP4	201628_s_at	RRAGA	46665_at	SEMA4C
206036_s_at	REL	212590_at	RRAS2	219194_at	SEMA4G
201783_s_at	RELA	201203_s_at	RRBP1	215479_at	SEMA6A
219041_s_at	REPIN1	216913_s_at	RRP12	214790_at	SENP6
202297_s_at	RER1	219037_at	RRP15	210657_s_at	SEPT4
203225_s_at	RFK	209567_at	RRS1	212414_s_at	SEPT6
218723_s_at	RGC32	213797_at	RSAD2	213666_at	SEPT6
204336_s_at	RGS19	212302_at	RTF1	217721_at	SEPT7
204337_at	RGS4	203724_s_at	RUFY3	208999_at	SEPT8
204338_s_at	RGS4	213437_at	RUFY3	211769_x_at	SERINC3
204339_s_at	RGS4	204198_s_at	RUNX3	221471_at	SERINC3
219489_s_at	RHBDL2	212319_at	RUTBC1	221472_at	SERINC3
216317_x_at	RHCE	214779_s_at	RUTBC3	221473_x_at	SERINC3
210586_x_at	RHD	215519_x_at	RUTBC3	206325_at	SERPINA6
212651_at	RHOBTB1	201459_at	RUVBL2	204855_at	SERPINB5
218598_at	RINT1	202449_s_at	RXRA	216811_at	SERPINB9
201785_at	RNASE1	212438_at	RY1	210049_at	SERPINC1
222349_x_at	RNF126P1	212440_at	RY1	207714_s_at	SERPINH1
219263_at	RNF128	208607_s_at	SAA2	219382_at	SERTAD3
212155_at	RNF187	214456_x_at	SAA2	213153_at	SETD1B
219035_s_at	RNF34	217946_s_at	SAE1	212465_at	SETD3
212696_s_at	RNF4	206671_at	SAG	203155_at	SETDB1
203160_s_at	RNF8	208740_at	SAP18	201356_at	SF3A1
211849_s_at	RNGTT	208742_s_at	SAP18	37462_i_at	SF3A2
218993_at	RNMTL1	213257_at	SARM1	200619_at	SF3B2
215523_at	RPA13G143	200069_at	SART3	213370_s_at	SFMBT1
201756_at	RPA2	41644_at	SASH1	202035_s_at	SFRP1
218441_s_at	RPAP1	215760_s_at	SBNO2	202036_s_at	SFRP1
212973_at	RPIA	201771_at	SCAMP3	202037_s_at	SFRP1
216589_at	RPL10	212329_at	SCAP	200685_at	SFRS11
217379_at	RPL10	200831_s_at	SCD	201696_at	SFRS4
200010_at	RPL11	200832_s_at	SCD	203380_x_at	SFRS5
203012_x_at	RPL23A	211708_s_at	SCD	208804_s_at	SFRS6
200013_at	RPL24	204035_at	SCG2	202774_s_at	SFRS8
218830_at	RPL26L1	219808_at	SCLY	200044_at	SFRS9
211666_x_at	RPL3	210363_s_at	SCN2B	213936_x_at	SFTPB
200674_s_at	RPL32	218672_at	SCNM1	208381_s_at	SGPL1
215208_x_at	RPL35A	208458_at	SCNN1D	211209_x_at	SH2D1A
202029_x_at	RPL38	210918_at	SCRG1	211211_x_at	SH2D1A
213689_x_at	RPL5	210382_at	SCTR	201810_s_at	SH3BP5
203436_at	RPP30	218427_at	SDCCAG3	201811_x_at	SH3BP5
200031_s_at	RPS11	203090_at	SDF2	209091_s_at	SH3GLB1
200819_s_at	RPS15	217855_x_at	SDF4	210101_x_at	SH3GLB1
201049_s_at	RPS18	202004_x_at	SDHC	213307_at	SHANK2
214097_at	RPS21	210131_x_at	SDHC	215251_at	SHANK2

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
217304_at	SHMT1	200826_at	SNRPD2	210825_s_at	STOM
219083_at	SHQ1	203832_at	SNRPF	216985_s_at	STX3
221705_s_at	SIKE	205644_s_at	SNRPG	203530_s_at	STX4
210779_x_at	SIP1	213364_s_at	SNX1	217874_at	SUCLG1
210792_x_at	SIVA1	220140_s_at	SNX11	215048_at	SUHW2
205817_at	SIX1	53912_at	SNX11	208831_x_at	SUPT6H
214977_at	SLA	206360_s_at	SOCS3	219389_at	SUSD4
217473_x_at	SLC11A1	208127_s_at	SOCS5	218619_s_at	SUV39H1
217691_x_at	SLC16A3	215078_at	SOD2	215370_at	SUZ12P
211576_s_at	SLC19A1	211819_s_at	SORBS1	44702_at	SYDE1
220554_at	SLC22A7	206122_at	SOX15	217833_at	SYNCRIP
221298_s_at	SLC22A8	219568_x_at	SOX18	205691_at	SYNGR3
218725_at	SLC25A22	208468_at	SOX21	221459_at	TAAR5
212085_at	SLC25A6	201418_s_at	SOX4	219992_at	TAC3
207560_at	SLC28A1	213668_s_at	SOX4	208183_at	TACR3
204717_s_at	SLC29A2	214732_at	SP1	201839_s_at	TACSTD1
201249_at	SLC2A1	208012_x_at	SP110	206613_s_at	TAF1A
201250_s_at	SLC2A1	209762_x_at	SP110	210053_at	TAF5
221262_s_at	SLC2A11	201240_s_at	SPCS2	205547_s_at	TAGLN
202498_s_at	SLC2A3	214404_x_at	SPDEF	200020_at	TARDBP
202499_s_at	SLC2A3	219257_s_at	SPHK1	211144_x_at	TARP
222088_s_at	SLC2A3	202363_at	SPOCK1	203648_at	TATDN2
207035_at	SLC30A3	218638_s_at	SPON2	215459_at	TAX1BP3
209326_at	SLC35A2	208927_at	SPOP	44696_at	TBC1D13
213119_at	SLC36A1	203458_at	SPR	203667_at	TBCA
200924_s_at	SLC3A2	214549_x_at	SPRR1A	201804_x_at	TBCB
219175_s_at	SLC41A3	208539_x_at	SPRR2D	216194_s_at	TBCB
205918_at	SLC4A3	212558_at	SPRY1	220789_s_at	TBRG4
209884_s_at	SLC4A7	208611_s_at	SPTAN1	207689_at	TBX10
207056_s_at	SLC4A8	205155_s_at	SPTBN2	202371_at	TCEAL4
210810_s_at	SLC6A5	202277_at	SPTLC1	200711_s_at	TCEB1P
201195_s_at	SLC7A5	203127_s_at	SPTLC2	202818_s_at	TCEB3
217248_s_at	SLC7A8	216202_s_at	SPTLC2	202819_s_at	TCEB3
208039_at	SLC9A2	209218_at	SQLE	212931_at	TCF20
219911_s_at	SLCO4A1	213562_s_at	SQLE	209151_x_at	TCF3
201827_at	SMARCD2	201858_s_at	SRGN	205513_at	TCN1
213253_at	SMC2	201859_at	SRGN	203742_s_at	TDG
212147_at	SMG5	203181_x_at	SRPK2	210323_at	TEKT2
34868_at	SMG5	204955_at	SRPX	212083_at	TEX261
209420_s_at	SMPD1	201225_s_at	SRRM1	203177_x_at	TFAM
218788_s_at	SMYD3	219919_s_at	SSH3	202750_s_at	TFIP11
209516_at	SMYD5	214556_at	SSTR4	214378_at	TFPI
219480_at	SNAI1	208064_s_at	ST8SIA3	209277_at	TFPI2
202507_s_at	SNAP25	202811_at	STAMBP	208249_s_at	TGDS
218327_s_at	SNAP29	207320_x_at	STAU1	213192_at	THAP3
204001_at	SNAPC3	208948_s_at	STAU1	201108_s_at	THBS1
217616_at	SNF1LK	213037_x_at	STAU1	201110_s_at	THBS1
218391_at	SNF8	40420_at	STK10	203083_at	THBS2
215011_at	SNHG3	208855_s_at	STK24	209561_at	THBS3
208821_at	SNRPB	215188_at	STK24	204776_at	THBS4
201342_at	SNRPC	202951_at	STK38	219477_s_at	THSD1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
219153_s_at	THSD4	211608_at	TRB@	208997_s_at	UCP2
201447_at	TIA1	219748_at	TREML2	208998_at	UCP2
201449_at	TIA1	219937_at	TRHDE	218190_s_at	UCRC
217500_at	TIAL1	211438_at	TRHR	218801_at	UGCGL2
203342_at	TIMM17B	210994_x_at	TRIM23	207392_x_at	UGT2B15
201666_at	TIMP1	202702_at	TRIM26	220746_s_at	UIMC1
212665_at	TIPARP	212116_at	TRIM27	209333_at	ULK1
47608_at	TJAP1	200990_at	TRIM28	215154_at	ULK2
35148_at	TJP3	213884_s_at	TRIM3	202706_s_at	UMPS
212770_at	TLE3	217760_at	TRIM44	211168_s_at	UPF1
212986_s_at	TLK2	211700_s_at	TRO	209137_s_at	USP10
209386_at	TM4SF1	211701_s_at	TRO	201672_s_at	USP14
209387_s_at	TM4SF1	210438_x_at	TROVE2	202681_at	USP4
208716_s_at	TMCO1	212839_s_at	TROVE2	202682_s_at	USP4
210768_x_at	TMCO1	212852_s_at	TROVE2	211800_s_at	USP4
203679_at	TMED1	217287_s_at	TRPC6	203117_s_at	USP52
208837_at	TMED3	220226_at	TRPM8	221514_at	UTP14A
220600_at	TMEM103	203578_s_at	TRPV6	203721_s_at	UTP18
203437_at	TMEM11	219581_at	TSEN2	213022_s_at	UTRN
220532_s_at	TMEM176B	201758_at	TSG101	208067_x_at	UTY
219569_s_at	TMEM22	202096_s_at	TSPO	213326_at	VAMP1
219503_s_at	TMEM40	213122_at	TSPYL5	202546_at	VAMP8
209656_s_at	TMEM47	218156_s_at	TSR1	202550_s_at	VAPB
218562_s_at	TMEM57	211694_at	TSSK1B	218806_s_at	VAV3
219449_s_at	TMEM70	201434_at	TTC1	204620_s_at	VCAN
212281_s_at	TMEM97	210645_s_at	TTC3	208648_at	VCP
218065_s_at	TMEM9B	210129_s_at	TTLL3	211662_s_at	VDAC2
205347_s_at	TMSL8	217261_at	TTTY2	205487_s_at	VGLL1
201645_at	TNC	209251_x_at	TUBA1C	214004_s_at	VGLL4
202509_s_at	TNFAIP2	211750_x_at	TUBA1C	203292_s_at	VPS11
202510_s_at	TNFAIP2	210527_x_at	TUBA3C	213686_at	VPS13A
210405_x_at	TNFRSF10B	209372_x_at	TUBB2B	217913_at	VPS4A
218368_s_at	TNFRSF12A	203273_s_at	TUSC2	205126_at	VRK2
218467_at	TNFSF5IP1	201175_at	TXNDC14	221725_at	WASF2
213201_s_at	TNNT1	208959_s_at	TXNDC4	203599_s_at	WBP4
212318_at	TNPO3	209080_x_at	TXNL2	56919_at	WDR48
206990_at	TNR	202836_s_at	TXNL4A	221712_s_at	WDR74
212261_at	TNRC15	218794_s_at	TXNL4B	216036_x_at	WDTC1
216208_s_at	TNXB	218382_s_at	U2AF2	212533_at	WEE1
222243_s_at	TOB2	200633_at	UBB	204710_s_at	WIPI2
203381_s_at	TOMM40	211296_x_at	UBC	71933_at	WNT6
212883_at	TOMM40	201898_s_at	UBE2A	217681_at	WNT7B
201519_at	TOMM70A	209141_at	UBE2G1	201294_s_at	WSB1
211987_at	TOP2B	200682_s_at	UBE2L3	201295_s_at	WSB1
204946_s_at	TOP3A	200683_s_at	UBE2L3	201296_s_at	WSB1
203050_at	TP53BP1	217393_x_at	UBE2NL	210561_s_at	WSB1
221218_s_at	TPK1	216315_x_at	UBE2V1	216074_x_at	WWC1
206116_s_at	TPM1	212403_at	UBE3B	218753_at	XKR8
204413_at	TRAF2	209088_s_at	UBN1	220020_at	XPNPEP3
202837_at	TRAFFD1	215544_s_at	UBOX5	218647_s_at	YRDC
35254_at	TRAFFD1	214881_s_at	UBTF	221180_at	YSK4

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
200639_s_at	YWHAZ	203730_s_at	ZKSCAN5	219224_x_at	ZNF408
201902_s_at	YY1	202778_s_at	ZMYM2	209944_at	ZNF410
204799_at	ZBED4	205714_s_at	ZMYND10	214746_s_at	ZNF467
214747_at	ZBED4	207402_at	ZNF132	218762_at	ZNF574
205883_at	ZBTB16	217242_at	ZNF154	221844_x_at	ZNF574
204181_s_at	ZBTB43	210291_s_at	ZNF174	204473_s_at	ZNF592
209851_at	ZC3H13	207417_s_at	ZNF177	219849_at	ZNF671
218348_s_at	ZC3H7A	203585_at	ZNF185	213659_at	ZNF75
220104_at	ZC3HAV1	219123_at	ZNF232	219627_at	ZNF767
221193_s_at	ZCCHC10	203707_at	ZNF263	221645_s_at	ZNF83
216871_at	ZDHHC17	205917_at	ZNF264	207021_at	ZPBP
219779_at	ZFHX4	204937_s_at	ZNF274	219904_at	ZSCAN5
201368_at	ZFP36L2	212892_at	ZNF282	217592_at	ZSWIM1
204893_s_at	ZFYVE9	209538_at	ZNF32	207189_s_at	ZZEF1
207197_at	ZIC3	219376_at	ZNF322A		

Tab V: regulierte Gene nach ELK3 siRNA vermittelte Inhibition in HA1EB, P-Wert < 0,05

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
210099_at	ABCA2	205062_x_at	ARID4A	219544_at	C13orf34
214033_at	ABCC6	201881_s_at	ARIH1	219164_s_at	C14orf103
202323_s_at	ACBD3	201230_s_at	ARIH2	219166_at	C14orf104
214763_at	ACOT11	211575_s_at	ARPC2	219203_at	C14orf122
201629_s_at	ACP1	212815_at	ASCC3	204289_at	C14orf45
216409_at	ACSL6	218115_at	ASF1B	221001_at	C15orf49
203872_at	ACTA1	213387_at	ATAD2B	210672_s_at	C16orf35
205481_at	ADORA1	208836_at	ATP1B3	221316_at	C19orf15
217729_s_at	AES	220556_at	ATP1B4	215954_s_at	C19orf29
210327_s_at	AGXT	202874_s_at	ATP6V1C1	219005_at	C19orf4
214766_s_at	AHCTF1	219659_at	ATP8A2	218932_at	C1orf181
202820_at	AHR	217701_x_at	ATRX	220992_s_at	C1orf25
208967_s_at	AK2	206232_s_at	B4GALT6	218721_s_at	C1orf27
205045_at	AKAP10	204966_at	BAI2	202597_at	C1orf74
209699_x_at	AKR1C2	221320_at	BCL2L10	218983_at	C1RL
202139_at	AKR7A2	204907_s_at	BCL3	50314_i_at	C20orf27
201952_at	ALCAM	204908_s_at	BCL3	220681_at	C22orf26
202022_at	ALDOC	219072_at	BCL7C	220172_at	C2orf37
214221_at	ALMS1	204129_at	BCL9	217767_at	C3
214340_at	ALOX12P2	201083_s_at	BCLAF1	208451_s_at	C4B
212360_at	AMPD2	201101_s_at	BCLAF1	213871_s_at	C6orf108
218575_at	ANAPC1	207432_at	BEST2	215380_s_at	C7orf24
205141_at	ANG	206133_at	BIRC4BP	207839_s_at	C9orf127
219081_at	ANKHD1	202701_at	BMP1	204480_s_at	C9orf16
218274_s_at	ANKZF1	217708_x_at	BRAP	222165_x_at	C9orf16
208103_s_at	ANP32E	215010_s_at	BRSK2	218904_s_at	C9orf40
206200_s_at	ANXA11	207722_s_at	BTBD2	220505_at	C9orf53
205196_s_at	AP1S1	208517_x_at	BTF3	213900_at	C9orf61
209462_at	APLP1	205548_s_at	BTG3	205199_at	CA9
208248_x_at	APLP2	203612_at	BYSL	210770_s_at	CACNA1A
206738_at	APOC4	218331_s_at	C10orf18	208432_s_at	CACNA1E
215931_s_at	ARFGEF2	210455_at	C10orf28	211314_at	CACNA1G
213039_at	ARHGEF18	204521_at	C12orf24	206996_x_at	CACNB1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
34726_at	CACNB3	212358_at	CLIP3	221699_s_at	DDX50
215259_s_at	CADM4	206158_s_at	CNBP	200934_at	DEK
201616_s_at	CALD1	207261_at	CNGA3	220295_x_at	DEPDC1
212077_at	CALD1	201445_at	CNN3	210788_s_at	DHRS7
200622_x_at	CALM3	210204_s_at	CNOT4	213868_s_at	DHRS7
200068_s_at	CANX	207940_x_at	CNR1	212649_at	DHX29
201850_at	CAPG	211203_s_at	CNTN1	212888_at	DICER1
200001_at	CAPNS1	203642_s_at	COBLL1	204405_x_at	DIMT1L
37012_at	CAPZB	216993_s_at	COL11A2	217106_x_at	DIMT1L
221912_s_at	CCDC28B	211809_x_at	COL13A1	201479_at	DKC1
217814_at	CCDC47	202311_s_at	COL1A1	216212_s_at	DKC1
218655_s_at	CCDC49	213428_s_at	COL6A1	204687_at	DKFZP310083
221685_s_at	CCDC99	203858_s_at	COX10	213546_at	DKFZP31140
216598_s_at	CCL2	33132_at	CPSF1	36552_at	DKFZP310123
200951_s_at	CCND2	211062_s_at	CPZ	213189_at	DKFZP310210
200812_at	CCT7	205843_x_at	CRAT	210762_s_at	DLC1
204581_at	CD22	205931_s_at	CREB5	205677_s_at	DLEU1
204192_at	CD37	211897_s_at	CRHR1	203764_at	DLG7
206804_at	CD3G	202551_s_at	CRIM1	206489_s_at	DLGAP1
206508_at	CD70	208978_at	CRIP2	37996_s_at	DMPK
205685_at	CD86	202226_s_at	CRK	205963_s_at	DNAJA3
203214_x_at	CDC2	210229_s_at	CSF2	203810_at	DNAJB4
210559_s_at	CDC2	208341_x_at	CSH2	203811_s_at	DNAJB4
207428_x_at	CDC2L1	206562_s_at	CSNK1A1	204720_s_at	DNAJC6
209288_s_at	CDC42EP3	208867_s_at	CSNK1A1	201697_s_at	DNMT1
215181_at	CDH22	213086_s_at	CSNK1A1	221677_s_at	DONSON
220679_s_at	CDH7	213860_x_at	CSNK1A1	214559_at	DRD3
207188_at	CDK3	202573_at	CSNK1G2	204751_x_at	DSC2
214907_at	CEACAM21	201218_at	CTBP2	215253_s_at	DSCR1
203973_s_at	CEBPD	210554_s_at	CTBP2	215254_at	DSCR1
213003_s_at	CEBPD	215377_at	CTBP2	203405_at	DSCR2
40020_at	CELSR3	202613_at	CTPS	200606_at	DSP
219591_at	CEND1	200661_at	CTSA	212253_x_at	DST
204962_s_at	CENPA	203657_s_at	CTSF	201044_x_at	DUSP1
207719_x_at	CEP170	221743_at	CUGBP1	208956_x_at	DUT
212746_s_at	CEP170	202213_s_at	CUL4B	204556_s_at	DZIP1
205382_s_at	CFD	36084_at	CUL7	201323_at	EBNA1BP2
206910_x_at	CFHR2	219805_at	CXorf56	201750_s_at	ECE1
204697_s_at	CHGA	213295_at	CYLD	218552_at	ECHDC2
204233_s_at	CHKA	207063_at	CYorf14	218282_at	EDEM2
202121_s_at	CHMP2A	206504_at	CYP24A1	220926_s_at	EDEM3
218571_s_at	CHMP4A	219837_s_at	CYTL1	209356_x_at	EFEMP2
211039_at	CHRNA1	218094_s_at	DBNDD2	208469_s_at	EGFL8
206635_at	CHRN2	206939_at	DCC	91703_at	EHBP1L1
204065_at	CHST10	222236_s_at	DDEFL1	221870_at	EHD2
221059_s_at	CHST6	207169_x_at	DDR1	45297_at	EHD2
205516_x_at	CIZ1	208895_s_at	DDX18	204410_at	EIF1AY
208474_at	CLDN6	208896_at	DDX18	218488_at	EIF2B3
206682_at	CLEC10A	208897_s_at	DDX18	201142_at	EIF2S1
201769_at	CLINT1	208152_s_at	DDX21	201143_s_at	EIF2S1
201975_at	CLIP1	205001_s_at	DDX3Y	208985_s_at	EIF3S1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
217364_x_at	EIF3S1	201637_s_at	FXR1	206951_at	HIST1H4E
217719_at	EIF3S6IP	209416_s_at	FZR1	202708_s_at	HIST2H2BE
200647_x_at	EIF3S8	202812_at	GAA	211654_x_at	HLA-DQB1
201510_at	ELF3	207112_s_at	GAB1	215193_x_at	HLA-DRB1
210827_s_at	ELF3	200645_at	GABARAP	203744_at	HMGB3
221094_s_at	ELP3	208463_at	GABRA4	221750_at	HMGCS1
209233_at	EMG1	208217_at	GABRR2	209709_s_at	HMMR
201340_s_at	ENC1	212379_at	GART	200751_s_at	HNRPC
220153_at	ENTPD7	217445_s_at	GART	214737_x_at	HNRPC
213579_s_at	EP300	204457_s_at	GAS1	213470_s_at	HNRPH1
201718_s_at	EPB41L2	209604_s_at	GATA3	200775_s_at	HNRPK
216437_at	EPC1	210627_s_at	GCS1	214918_at	HNRPM
210651_s_at	EPHB2	201864_at	GDI1	200593_s_at	HNRPU
211165_x_at	EPHB2	203539_s_at	GFAP	213793_s_at	HOMER1
204600_at	EPHB3	205722_s_at	GFRA2	213150_at	HOXA10
200842_s_at	EPRS	208284_x_at	GGT1	208557_at	HOXA6
217941_s_at	ERBB2IP	211417_x_at	GGT1	206847_s_at	HOXA7
202444_s_at	ERLIN1	205582_s_at	GGTLA1	208224_at	HOXB1
207061_at	ERN1	204836_at	GLDC	204779_s_at	HOXB7
211234_x_at	ESR1	205280_at	GLRB	216973_s_at	HOXB7
222262_s_at	ETNK1	218146_at	GLT8D1	207373_at	HOXD10
203348_s_at	ETV5	35820_at	GM2A	220927_s_at	HPSE2
204774_at	EVI2A	204248_at	GNA11	213926_s_at	HRB
204503_at	EVPL	214679_x_at	GNA11	213928_s_at	HRB
214507_s_at	EXOSC2	201040_at	GNAI2	205465_x_at	HS3ST1
206329_at	EXTL1	215996_at	GNAI2	207020_at	HSF2BP
206795_at	F2RL2	210328_at	GNMT	216450_x_at	HSP90B1
218248_at	FAM111A	201618_x_at	GPAA1	200691_s_at	HSPA9
52975_at	FAM125B	211060_x_at	GPAA1	200692_s_at	HSPA9
202916_s_at	FAM20B	202755_s_at	GPC1	214011_s_at	HSPC111
220408_x_at	FAM48A	218151_x_at	GPR172A	200806_s_at	HSPD1
203184_at	FBN2	221306_at	GPR27	217900_at	IARS2
221519_at	FBXW4	203108_at	GPRC5A	208965_s_at	IFI16
205237_at	FCN1	206709_x_at	GPT	204439_at	IFI44L
204421_s_at	FGF2	206204_at	GRB14	207964_x_at	IFNA4
204422_s_at	FGF2	208035_at	GRM6	208259_x_at	IFNA7
214170_x_at	FH	206712_at	GRTP1	202146_at	IFRD1
221007_s_at	FIP1L1	200696_s_at	GSN	219174_at	IFT74
218034_at	FIS1	203815_at	GSTT1	216493_s_at	IGF2BP3
204560_at	FKBP5	210891_s_at	GTF2I	201508_at	IGFBP4
222007_s_at	FKBP8	211040_x_at	GTSE1	217378_x_at	IGK1CR2-108
218920_at	FLJ10404	206647_at	HBZ	222062_at	IL27RA
220912_at	FLJ11827	218537_at	HCFC1R1	204863_s_at	IL6ST
211724_x_at	FLJ20323	45714_at	HCFC1R1	204864_s_at	IL6ST
218416_s_at	FLJ20489	215349_at	hCG_1730474	211000_s_at	IL6ST
220584_at	FLJ22184	216484_x_at	HDGF	217804_s_at	ILF3
220269_at	FLJ23049	217317_s_at	HERC2P2	203126_at	IMPA2
212547_at	FLJ35348	211185_s_at	HIATL1	203331_s_at	INPP5D
212791_at	FLJ38984	222123_s_at	HIF3A	206502_s_at	INSM1
214752_x_at	FLNA	209559_at	HIP1R	210114_at	INVS
219170_at	FSD1	208575_at	HIST1H3A	200992_at	IPO7

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
211707_s_at	IQCB1	217693_x_at	LOC388335	219332_at	MICALL2
201587_s_at	IRAK1	65588_at	LOC388796	203636_at	MID1
202621_at	IRF3	65472_at	LOC388969	214246_x_at	MINK1
219361_s_at	ISG20L1	222085_at	LOC400451	218071_s_at	MKRN2
209743_s_at	ITCH	220341_s_at	LOC51149	200948_at	MLF2
210184_at	ITGAX	41397_at	LOC55565	202520_s_at	MLH1
49679_s_at	ITGB4BP	216384_x_at	LOC643287	160020_at	MMP14
217251_x_at	IVD	215369_at	LOC90120	217279_x_at	MMP14
206245_s_at	IVNS1ABP	91952_at	LOC90379	206205_at	MPHOSPH9
202138_x_at	JTV1	221640_s_at	LRDD	206764_x_at	MPPE1
209971_x_at	JTV1	222068_s_at	LRRC50	209280_at	MRC2
221413_at	KCNAB3	208771_s_at	LTA4H	37408_at	MRC2
220540_at	KCNK15	220099_s_at	LUC7L2	217919_s_at	MRPL42
203712_at	KIAA0020	202145_at	LY6E	212604_at	MRPS31
204307_at	KIAA0329	52169_at	LYK5	216320_x_at	MST1
212456_at	KIAA0664	215566_x_at	LYPLA2	216095_x_at	MTMR1
212314_at	KIAA0746	221261_x_at	MAGED4	220953_s_at	MTMR12
212634_at	KIAA0776	220302_at	MAK	203200_s_at	MTRR
215140_at	KIAA1199	221697_at	MAP1LC3C	217109_at	MUC4
221078_s_at	KIAA1212	202424_at	MAP2K2	220074_at	MUCDHL
220911_s_at	KIAA1305	213490_s_at	MAP2K2	202086_at	MX1
212162_at	KIDINS220	210284_s_at	MAP3K7IP2	204994_at	MX2
221258_s_at	KIF18A	212567_s_at	MAP4	212347_x_at	MXD4
203389_at	KIF3C	33850_at	MAP4	219098_at	MYBBP1A
203390_s_at	KIF3C	204936_at	MAP4K2	215182_x_at	MYH9
201992_s_at	KIF5B	216139_s_at	MAPK8IP3	204173_at	MYL6B
219657_s_at	KLF3	208210_at	MAS1	219173_at	MYO15B
219157_at	KLHL2	209331_s_at	MAX	203215_s_at	MYO6
221838_at	KLHL22	205018_s_at	MBNL2	218713_at	NARG2
204733_at	KLK6	207323_s_at	MBP	217884_at	NAT10
213507_s_at	KPNB1	211340_s_at	MCAM	211685_s_at	NCALD
216713_at	KRIT1	221354_s_at	MCHR1	212789_at	NCAPD3
212236_x_at	KRT17	200796_s_at	MCL1	211063_s_at	NCK1
207908_at	KRT2	202107_s_at	MCM2	200610_s_at	NCL
208483_x_at	KRT33A	215581_s_at	MCM3AP	208759_at	NCSTN
207787_at	KRT33B	201755_at	MCM5	206453_s_at	NDRG2
206969_at	KRT34	216237_s_at	MCM5	209159_s_at	NDRG4
214580_x_at	KRT5	217373_x_at	MDM2	204125_at	NDUFAF1
207878_at	KRT76	212693_at	MDN1	201226_at	NDUFB8
215189_at	KRT86	210154_at	ME2	203606_at	NDUFS6
218587_s_at	KTELC1	208110_x_at	MED25	206948_at	NEU3
219955_at	L1TD1	218372_at	MED9	202585_s_at	NFX1
202019_s_at	LANCL1	209926_at	MEF2B	206814_at	NGFB
214039_s_at	LAPTM4B	207251_at	MEP1B	207108_s_at	NIPBL
201721_s_at	LAPTM5	211913_s_at	MERTK	212469_at	NIPBL
214155_s_at	LARP4	213807_x_at	MET	203866_at	NLE1
204854_at	LEPREL2	209265_s_at	METTL3	218889_at	NOC3L
214045_at	LIAS	209758_s_at	MFAP5	214427_at	NOL1
202726_at	LIG1	211801_x_at	MFN1	218199_s_at	NOL6
206124_s_at	LLGL1	212945_s_at	MAG	218244_at	NOL8
219775_s_at	LMAN1L	220189_s_at	MGAT4B	219110_at	NOLA1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
205895_s_at	NOLC1	212092_at	PEG10	202529_at	PRPSAP1
211949_s_at	NOLC1	218590_at	PEO1	221734_at	PRRC1
201695_s_at	NP	205251_at	PER2	220433_at	PRRG3
216387_x_at	NPM1	205094_at	PEX12	215923_s_at	PSD4
221691_x_at	NPM1	218336_at	PFDN2	205602_x_at	PSG7
221923_s_at	NPM1	213469_at	PGAP1	201532_at	PSMA3
214066_x_at	NPR2	206288_at	PGGT1B	212220_at	PSME4
207978_s_at	NR4A3	201968_s_at	PGM1	221292_at	PTCH2
209959_at	NR4A3	40446_at	PHF1	211663_x_at	PTGDS
206237_s_at	NRG1	217952_x_at	PHF3	212187_x_at	PTGDS
204081_at	NRGN	212542_s_at	PHIP	207388_s_at	PTGES
205136_s_at	NUFIP1	215286_s_at	PHTF2	215813_s_at	PTGS1
218768_at	NUP107	215832_x_at	PICALM	207011_s_at	PTK7
218622_at	NUP37	203879_at	PIK3CD	200772_x_at	PTMA
218295_s_at	NUP50	209019_s_at	PINK1	211921_x_at	PTMA
214935_at	NUP62	201080_at	PIP5K2B	212029_s_at	PTOV1
204972_at	OAS2	220548_at	PKDREJ	209895_at	PTPN11
218400_at	OAS3	202161_at	PKN1	209896_s_at	PTPN11
215947_s_at	OAZ1	201929_s_at	PKP4	214043_at	PTPRD
205441_at	OCEL1	221027_s_at	PLA2G12A	204945_at	PTPRN
203446_s_at	OCRL	60528_at	PLA2G4B	203030_s_at	PTPRN2
212307_s_at	OGT	216551_x_at	PLCG1	221277_s_at	PUS3
221353_at	OR3A1	201373_at	PLEC1	221025_x_at	PUS7L
200714_x_at	OS9	201939_at	PLK2	209336_at	PWP2
201799_s_at	OSBP	200827_at	PLOD1	212013_at	PXDN
208158_s_at	OSBPL1A	202430_s_at	PLSCR1	221666_s_at	PYCARD
209626_s_at	OSBPL3	214473_x_at	PMS2L3	204044_at	QPRT
210344_at	OSBPL7	203622_s_at	PNO1	219178_at	QTRTD1
216422_at	PA2G4	203718_at	PNPLA6	220955_x_at	RAB23
200907_s_at	PALLD	219152_at	PODXL2	219562_at	RAB26
212718_at	PAPOLA	202996_at	POLD4	208466_at	RAB3D
221526_x_at	PARD3	219317_at	POLI	201140_s_at	RAB5C
204005_s_at	PAWR	207515_s_at	POLR1C	203223_at	RABEP1
202875_s_at	PBX2	205218_at	POLR3F	203150_at	RABEPK
203557_s_at	PCBD1	206653_at	POLR3G	218785_s_at	RABL5
213369_at	PCDH21	218476_at	POMT1	213603_s_at	RAC2
211365_s_at	PCDHA2	213449_at	POP1	210826_x_at	RAD17
211870_s_at	PCDHA3	207084_at	POU3F2	201222_s_at	RAD23B
209079_x_at	PCDHGA1	214532_x_at	POU5F1P1	209965_s_at	RAD51L3
211879_x_at	PCDHGA3	221649_s_at	PPAN	204558_at	RAD54L
215836_s_at	PCDHGC3	206547_s_at	PPEF1	209051_s_at	RALGDS
213558_at	PCLO	215280_s_at	PPFIA3	201711_x_at	RANBP2
217816_s_at	PCNP	201602_s_at	PPP1R12A	201713_s_at	RANBP2
213159_at	PCNX	204555_s_at	PPP1R3D	211955_at	RANBP5
213173_at	PCNX	213483_at	PPWD1	210621_s_at	RASA1
219295_s_at	PCOLCE2	211531_x_at	PRB1	212706_at	RASA4
207239_s_at	PCTK1	202919_at	PREI3	216242_x_at	RASA4
218953_s_at	PCYOX1L	211380_s_at	PRKG1	205801_s_at	RASGRP3
212593_s_at	PDCD4	214941_s_at	PRPF40A	204927_at	RASSF7
211564_s_at	PDLIM4	208447_s_at	PRPS1	202034_x_at	RB1CC1
219630_at	PDZK1IP1	209440_at	PRPS1	212030_at	RBM25

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
219754_at	RBM41	215038_s_at	SETD2	205185_at	SPINK5
209219_at	RDBP	220946_s_at	SETD2	204640_s_at	SPOP
204969_s_at	RDX	218720_x_at	SEZ6L2	200672_x_at	SPTBN1
205923_at	RELN	201071_x_at	SF3B1	201247_at	SREBF2
218194_at	REXO2	201742_x_at	SFRS1	201516_at	SRM
204023_at	RFC4	211735_x_at	SFTPC	208800_at	SRP72
212968_at	RFNG	221269_s_at	SH3BGL3	204955_at	SRPX
218723_s_at	RGC32	211115_x_at	SIP1	213140_s_at	SS18L1
209110_s_at	RGL2	221010_s_at	SIRT5	207983_s_at	STAG2
210586_x_at	RHD	206634_at	SIX3	213103_at	STARD13
206454_s_at	RHO	202782_s_at	SKIP	M97935_3_at	STAT1
209441_at	RHOBTB2	217507_at	SLC11A1	M97935_MA_at	STAT1
214700_x_at	RIF1	203125_x_at	SLC11A2	/M97935_MB_at	STAT1
218861_at	RNF25	208354_s_at	SLC12A3	203438_at	STC2
211849_s_at	RNGTT	213590_at	SLC16A5	221701_s_at	STRA6
202684_s_at	RNMT	212833_at	SLC25A46	215505_s_at	STRN3
207939_x_at	RNPS1	212826_s_at	SLC25A6	207346_at	STX2
200088_x_at	RPL12	201250_s_at	SLC2A1	209367_at	STXBP2
215208_x_at	RPL35A	218494_s_at	SLC2A4RG	216271_x_at	SYDE1
201909_at	RPS4Y1	204429_s_at	SLC2A5	209025_s_at	SYNCRIP
204171_at	RPS6KB1	207035_at	SLC30A3	205691_at	SYNGR3
212589_at	RRAS2	217289_s_at	SLC37A4	200911_s_at	TACC1
212590_at	RRAS2	202089_s_at	SLC39A6	206613_s_at	TAF1A
201203_s_at	RRBP1	202667_s_at	SLC39A7	204877_s_at	TAOK2
216902_s_at	RRN3	217859_s_at	SLC39A9	208829_at	TAPBP
216908_x_at	RRN3	200924_s_at	SLC3A2	214060_at	TAS2R5
218307_at	RSAD1	211030_s_at	SLC6A6	33778_at	TBC1D22A
212302_at	RTF1	209921_at	SLC7A11	212052_s_at	TBC1D9B
34408_at	RTN2	205864_at	SLC7A4	211052_s_at	TBCD
201459_at	RUUBL2	201195_s_at	SLC7A5	203919_at	TCEA2
202598_at	S100A13	216604_s_at	SLC7A8	202818_s_at	TCEB3
208607_s_at	SAA2	207053_at	SLC8A1	209151_x_at	TCF3
214456_x_at	SAA2	205187_at	SMAD5	209152_s_at	TCF3
219691_at	SAMD9	213720_s_at	SMARCA4	209153_s_at	TCF3
204502_at	SAMHD1	202303_x_at	SMARCA5	215260_s_at	TCF3
208740_at	SAP18	204240_s_at	SMC2	205513_at	TCN1
210862_s_at	SARDH	212577_at	SMCHD1	203743_s_at	TDG
209486_at	SAS10	212579_at	SMCHD1	210323_at	TEKT2
212417_at	SCAMP1	220368_s_at	SMEK1	209338_at	TFCP2
212138_at	SCC-112	212147_at	SMG5	204147_s_at	TFDP1
208458_at	SCNN1D	209420_s_at	SMPD1	203589_s_at	TFDP2
202542_s_at	SCYE1	205596_s_at	SMURF2	209909_s_at	TGFB2
205607_s_at	SCYL3	218033_s_at	SNN	220407_s_at	TGFB2
202898_at	SDC3	205329_s_at	SNX4	218724_s_at	TGIF2
218427_at	SDCCAG3	219568_x_at	SOX18	201108_s_at	THBS1
201582_at	SEC23B	214732_at	SP1	201109_s_at	THBS1
216392_s_at	SEC23IP	219888_at	SPAG4	201110_s_at	THBS1
219259_at	SEMA4A	207724_s_at	SPAST	215775_at	THBS1
202319_at	SENP6	218933_at	SPATA5L1	204776_at	THBS4
213666_at	SEPT6	201240_s_at	SPCS2	212994_at	THOC2
219382_at	SERTAD3	214403_x_at	SPDEF	212209_at	THRAP2

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
221938_x_at	THRAP5	215042_at	TXNDC5	206484_s_at	XPNPEP2
201446_s_at	TIA1	218794_s_at	TXNL4B	221939_at	YIPF2
201450_s_at	TIA1	205546_s_at	TYK2	216304_x_at	YME1L1
202406_s_at	TIAL1	209340_at	UAP1	206063_x_at	YPEL1
218316_at	TIMM9	217393_x_at	UBE2NL	212455_at	YTHDC1
204277_s_at	TK2	216315_x_at	UBE2V1	203043_at	ZBED1
202195_s_at	TMED5	209088_s_at	UBN1	205883_at	ZBTB16
219569_s_at	TMEM22	212007_at	UBXD2	205256_at	ZBTB39
219503_s_at	TMEM40	215983_s_at	UBXD6	206098_at	ZBTB6
213024_at	TMF1	220083_x_at	UCHL5	201593_s_at	ZC3H15
218790_s_at	TMLHE	221384_at	UCP1	213445_at	ZC3H3
209225_x_at	TNPO1	220775_s_at	UEVLD	218348_s_at	ZC3H7A
217413_s_at	TNXB	220746_s_at	UIMC1	220472_at	ZCCHC4
204080_at	TOE1	209333_at	ULK1	211962_s_at	ZFP36L1
201870_at	TOMM34	215154_at	ULK2	207068_at	ZFP37
203381_s_at	TOMM40	212144_at	UNC84B	219536_s_at	ZFP64
201291_s_at	TOP2A	218757_s_at	UPF3B	207920_x_at	ZFX
213660_s_at	TOP3B	202152_x_at	USF2	207246_at	ZFY
214195_at	TPP1	201672_s_at	USP14	219877_at	ZMAT4
203374_s_at	TPP2	218367_x_at	USP21	202049_s_at	ZMYM4
201730_s_at	TPR	212381_at	USP24	205714_s_at	ZMYND10
216474_x_at	TPSAB1	221513_s_at	UTP14A	216663_s_at	ZMYND10
210052_s_at	TPX2	209725_at	UTP20	200050_at	ZNF146
213443_at	TRADD	208067_x_at	UTY	207513_s_at	ZNF189
201398_s_at	TRAM1	214115_at	VAMP5	205855_at	ZNF197
210733_at	TRAM1	201831_s_at	VDP	204327_s_at	ZNF202
210994_x_at	TRIM23	204254_s_at	VDR	213858_at	ZNF250
210995_s_at	TRIM23	203683_s_at	VEGFB	205917_at	ZNF264
212116_at	TRIM27	208621_s_at	VIL2	215701_at	ZNF291
215444_s_at	TRIM31	217234_s_at	VIL2	219376_at	ZNF322A
217759_at	TRIM44	218396_at	VPS13C	209814_at	ZNF330
210705_s_at	TRIM5	218679_s_at	VPS28	216273_at	ZNF460
202734_at	TRIP10	219679_s_at	WAC	214746_s_at	ZNF467
211700_s_at	TRO	200628_s_at	WARS	215019_x_at	ZNF528
203578_s_at	TRPV6	218512_at	WDR12	220709_at	ZNF556
218156_s_at	TSR1	218107_at	WDR26	220215_at	ZNF669
215106_at	TTC22	201420_s_at	WDR77	205089_at	ZNF7
218710_at	TTC27	201421_s_at	WDR77	219627_at	ZNF767
210129_s_at	TTLL3	202664_at	WIPF1	219781_s_at	ZNF771
216673_at	TTY1	216006_at	WIPF2	215767_at	ZNF804A
214983_at	TTY15	218775_s_at	WWC2	207021_at	ZBPB
214876_s_at	TUBGCP5	202134_s_at	WWTR1	219904_at	ZSCAN5
				211950_at	ZUBR1

Tab. VI: regulierte Gene nach SRF siRNA vermittelte Inhibition in HA1ER, P-Wert < 0,05

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
219488_at	A4GALT	211224_s_at	ABCB11	213017_at	ABHD3
216066_at	ABCA1	208562_s_at	ABCC9	216716_at	ABO
215465_at	ABCA12	202850_at	ABCD3	203559_s_at	ABP1
217504_at	ABCA6	214232_at	ABCF2	215231_at	ABP1
219577_s_at	ABCA7	218633_x_at	ABHD10	215353_at	ABP1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
202002_at	ACAA2	217111_at	AMACR	207675_x_at	ARTN
200710_at	ACADVL	208220_x_at	AMELY	210237_at	ARTN
205377_s_at	ACHE	204294_at	AMT	216052_x_at	ARTN
201127_s_at	ACLY	218167_at	AMZ2	212818_s_at	ASB1
210337_s_at	ACLY	206423_at	ANGPTL7	212819_at	ASB1
200793_s_at	ACO2	206385_s_at	ANK3	205673_s_at	ASB9
208002_s_at	ACOT7	219081_at	ANKHD1	209985_s_at	ASCL1
215728_s_at	ACOT7	220280_s_at	ANKMY1	213561_at	ASF1A
209601_at	ACOX1	219069_at	ANKRD49	209394_at	ASMTL
213683_at	ACSL6	216225_at	ANTXR1	205047_s_at	ASNS
201550_x_at	ACTG1	201012_at	ANXA1	216000_at	ASNS
211983_x_at	ACTG1	209860_s_at	ANXA7	219918_s_at	ASPM
213214_x_at	ACTG1	201613_s_at	AP1G2	218908_at	ASPSCR1
221607_x_at	ACTG1	214341_at	AP1G2	209693_at	ASTN2
214957_at	ACTL8	211779_x_at	AP2A2	215407_s_at	ASTN2
202135_s_at	ACTR1B	209870_s_at	APBA2	215828_at	ATBF1
218658_s_at	ACTR8	215148_s_at	APBA3	204833_at	ATG12
208222_at	ACVR1B	201284_s_at	APEH	220237_at	ATG3
202603_at	ADAM10	208248_x_at	APLP2	212280_x_at	ATG4B
208269_s_at	ADAM28	208701_at	APLP2	208871_at	ATN1
211238_at	ADAM7	215150_at	APOA2	203296_s_at	ATP1A2
220866_at	ADAMTS6	220023_at	APOB48R	211586_s_at	ATP2B2
207175_at	ADIPOQ	207158_at	APOBEC1	207026_s_at	ATP2B3
210960_at	ADRA1D	221653_x_at	APOL2	212135_s_at	ATP2B4
201401_s_at	ADRBK1	220478_at	APOL5	213041_s_at	ATP5D
213078_x_at	AGPAT7	202629_at	APPBP2	202325_s_at	ATP5J
209173_at	AGR2	218158_s_at	APPL1	206993_at	ATP5S
212285_s_at	AGRN	203747_at	AQP3	201171_at	ATP6V0E1
217419_x_at	AGRN	210067_at	AQP4	201972_at	ATP6V1A
204499_at	AGTPBP1	217153_at	ARHGAP1	201089_at	ATP6V1B2
221008_s_at	AGXT2L1	212738_at	ARHGAP19	202872_at	ATP6V1C1
204551_s_at	AHSG	37577_at	ARHGAP19	202874_s_at	ATP6V1C1
215051_x_at	AIF1	215955_x_at	ARHGAP26	217068_at	ATP8A2
212172_at	AK2	37117_at	ARHGAP8	211852_s_at	ATRN
210626_at	AKAP1	201167_x_at	ARHGDIA	216539_at	ATXN3L
222023_at	AKAP13	213606_s_at	ARHGDIA	216140_at	ATXN7L1
201900_s_at	AKR1A1	203055_s_at	ARHGEF1	208260_at	AVPR1B
202139_at	AKR7A2	202548_s_at	ARHGEF7	211812_s_at	B3GALNT1
214259_s_at	AKR7A2	203264_s_at	ARHGEF9	215055_at	B3GNTL1
206469_x_at	AKR7A3	212614_at	ARID5B	216286_at	B4GALT6
216381_x_at	AKR7A3	219842_at	ARL15	203051_at	BAHD1
218489_s_at	ALAD	202091_at	ARL2BP	204966_at	BAI2
203180_at	ALDH1A3	213759_at	ARL4C	208132_x_at	BAT2
202053_s_at	ALDH3A2	221758_at	ARMC6	212081_x_at	BAT2
204941_s_at	ALDH3B2	219096_at	ARMC7	214201_x_at	BAT2
204290_s_at	ALDH6A1	219335_at	ARMCX5	201255_x_at	BAT3
221589_s_at	ALDH6A1	215457_at	ARPC1A	210208_x_at	BAT3
214687_x_at	ALDOA	217217_at	ARPC1B	213318_s_at	BAT3
205621_at	ALKBH1	211575_s_at	ARPC2	215437_x_at	BAZ2A
207381_at	ALOX12B	204443_at	ARSA	205363_at	BBOX1
207708_at	ALOXE3	206831_s_at	ARSD	37547_at	BBS9

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
216776_at	BCAP29	221231_s_at	C14orf102	210735_s_at	CA12
217657_at	BCAP29	215986_at	C14orf135	204865_at	CA3
202030_at	BCKDK	218298_s_at	C14orf159	214933_at	CACNA1A
205263_at	BCL10	219526_at	C14orf169	207162_s_at	CACNA1B
204907_s_at	BCL3	215872_at	C14orf56	210108_at	CACNA1D
204908_s_at	BCL3	203289_s_at	C16orf35	209031_at	CADM1
219444_at	BCORL1	221993_s_at	C16orf42	205626_s_at	CALB1
218285_s_at	BDH2	222190_s_at	C16orf58	215199_at	CALD1
208945_s_at	BECN1	219146_at	C17orf42	207243_s_at	CALM2
213709_at	BHLHB9	219417_s_at	C17orf59	210019_at	CALML3
219902_at	BHMT2	207259_at	C17orf73	210020_x_at	CALML3
202094_at	BIRC5	221621_at	C17orf86	215161_at	CAMK1G
203840_at	BLZF1	207996_s_at	C18orf1	218309_at	CAMK2N1
32088_at	BLZF1	213616_at	C18orf10	221040_at	CAPN10
214716_at	BMP2K	204699_s_at	C1orf107	214475_x_at	CAPN3
209920_at	BMPR2	215900_at	C1orf121	208374_s_at	CAPZA1
206464_at	BMX	203197_s_at	C1orf123	204950_at	CARD8
213473_at	BRAP	219988_s_at	C1orf164	218384_at	CARHSP1
216521_s_at	BRCC3	219567_s_at	C1orf176	209811_at	CASP2
203754_s_at	BRF1	219063_at	C1orf35	208340_at	CASP4
218954_s_at	BRF2	216935_at	C1orf46	209682_at	CBLB
218955_at	BRF2	202560_s_at	C1orf77	212816_s_at	CBS
219280_at	BRWD1	220199_s_at	C1orf80	206037_at	CCBL1
207722_s_at	BTBD2	202953_at	C1QB	220321_s_at	CCDC121
207326_at	BTC	216962_at	C1QBP	208094_s_at	CCDC130
214116_at	BTD	214346_at	C1QL1	220908_at	CCDC33
215425_at	BTG3	220975_s_at	C1QTNF1	204609_at	CCDC85B
205504_at	BTK	221762_s_at	C20orf67	221685_s_at	CCDC99
205299_s_at	BTN2A2	220681_at	C22orf26	32128_at	CCL18
208585_at	BTN2A3	209906_at	C3AR1	206988_at	CCL25
204821_at	BTN3A3	205654_at	C4BPA	214038_at	CCL8
38241_at	BTN3A3	201310_s_at	C5orf13	204826_at	CCNF
200777_s_at	BZW1	218518_at	C5orf5	202770_s_at	CCNG2
220703_at	C10orf110	220614_s_at	C6orf103	219470_x_at	CCNJ
219601_s_at	C10orf12	220513_at	C6orf148	219227_at	CCNJL
212502_at	C10orf22	213314_at	C6orf162	221427_s_at	CCNL2
210455_at	C10orf28	213810_s_at	C6orf166	214638_s_at	CCNT2
212419_at	C10orf56	221301_at	C6orf27	206983_at	CCR6
220539_at	C10orf92	211350_s_at	C6orf54	220351_at	CCRL1
214128_at	C11orf11	208809_s_at	C6orf62	203522_at	CCS
217969_at	C11orf2	219006_at	C6orf66	200873_s_at	CCT8
218314_s_at	C11orf57	53202_at	C7orf25	208651_x_at	CD24
204073_s_at	C11orf9	219261_at	C7orf26	206488_s_at	CD36
217462_at	C11orf9	47083_at	C7orf26	205456_at	CD3E
221067_s_at	C12orf39	206497_at	C7orf44	216424_at	CD4
218374_s_at	C12orf4	208266_at	C8orf17	207549_x_at	CD46
221821_s_at	C12orf41	207839_s_at	C9orf127	208783_s_at	CD46
64432_at	C12orf47	217130_at	C9orf33	211574_s_at	CD46
221777_at	C12orf52	215390_at	C9orf5	201925_s_at	CD55
219544_at	C13orf34	219223_at	C9orf7	216322_at	CD58
202563_at	C14orf1	220050_at	C9orf9	214551_s_at	CD7

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
205288_at	CDC14A	219890_at	CLEC5A	208303_s_at	CRLF2
210743_s_at	CDC14A	217382_at	CLIC1	204349_at	CRSP9
207428_x_at	CDC2L1	203229_s_at	CLK2	204350_s_at	CRSP9
215169_at	CDC2L2	221042_s_at	CLMN	207531_at	CRYGC
208727_s_at	CDC42	204980_at	CLOCK	211287_x_at	CSF2RA
208728_s_at	CDC42	216007_at	CLSTN2	206475_x_at	CSH1
214230_at	CDC42	222043_at	CLU	208357_x_at	CSH1
203794_at	CDC42BPA	205518_s_at	CMAH	203807_x_at	CSH2
214721_x_at	CDC42EP4	206158_s_at	CNBP	208866_at	CSNK1A1
218157_x_at	CDC42SE1	210769_at	CNGB1	208774_at	CSNK1D
201131_s_at	CDH1	200860_s_at	CNOT1	39966_at	CSPG5
205533_s_at	CDH6	222182_s_at	CNOT2	214187_x_at	CTDSPL
203469_s_at	CDK10	210203_at	CNOT4	203081_at	CTNBP1
210622_x_at	CDK10	210867_at	CNOT4	214731_at	CTTNBP2NL
204995_at	CDK5R1	219400_at	CNTNAP1	36084_at	CUL7
220935_s_at	CDK5RAP2	211032_at	COBLL1	218970_s_at	CUTC
218740_s_at	CDK5RAP3	203654_s_at	COIL	214743_at	CUTL1
213182_x_at	CDKN1C	211343_s_at	COL13A1	203917_at	CXADR
216894_x_at	CDKN1C	209081_s_at	COL18A1	205242_at	CXCL13
219534_x_at	CDKN1C	217435_x_at	COL1A1	207852_at	CXCL5
211156_at	CDKN2A	201852_x_at	COL3A1	217119_s_at	CXCR3
210240_s_at	CDKN2D	212937_s_at	COL6A1	212961_x_at	CXorf40B
205910_s_at	CEL	212940_at	COL6A1	205583_s_at	CXorf45
204539_s_at	CELSR1	213428_s_at	COL6A1	205584_at	CXorf45
36499_at	CELSR2	213290_at	COL6A2	205088_at	CXorf6
219472_at	CENPO	204724_s_at	COL9A3	48580_at	CXXC1
218950_at	CENTD3	216764_at	COMMD1	220230_s_at	CYB5R2
219311_at	CEP76	216773_at	COMMD1	201885_s_at	CYB5R3
215388_s_at	CFHR1	201098_at	COPB2	214131_at	CYorf15B
208088_s_at	CFHR5	218760_at	COQ6	206504_at	CYP24A1
215703_at	CFTR	64486_at	CORO1B	216334_s_at	CYP2A7P1
214887_at	CG018	216799_at	CORO2B	208126_s_at	CYP2C18
216170_at	CHCHD3	204643_s_at	COVA1	217558_at	CYP2C9
218642_s_at	CHCHD7	214277_at	COX11	220432_s_at	CYP39A1
205393_s_at	CHEK1	201256_at	COX7A2L	205765_at	CYP3A5
202229_s_at	CHERP	205615_at	CPA1	211231_x_at	CYP4A11
204193_at	CHKB	206368_at	CPLX2	210452_x_at	CYP4F2
204591_at	CHL1	202118_s_at	CPNE3	210576_at	CYP4F8
206079_at	CHML	202119_s_at	CPNE3	205471_s_at	DACH1
202538_s_at	CHMP2B	219707_at	CPNE7	219179_at	DACT1
211419_s_at	CHN2	217994_x_at	CPSF3L	208822_s_at	DAP3
213385_at	CHN2	202470_s_at	CPSF6	208282_x_at	DAZ2
218927_s_at	CHST12	205843_x_at	CRAT	215976_at	DBC1
214863_at	CHST7	209522_s_at	CRAT	206661_at	DBF4B
205007_s_at	CIB2	212345_s_at	CREB3L2	222234_s_at	DBNDD1
205008_s_at	CIB2	202160_at	CREBBP	211196_at	DBT
212309_at	CLASP2	208978_at	CRIP2	217426_at	DCC1
206165_s_at	CLCA2	218643_s_at	CRIP2	201894_s_at	DCN
217528_at	CLCA2	210262_at	CRISP2	205337_at	DCT
205985_x_at	CLCNKB	207802_at	CRISP3	216513_at	DCT
206909_at	CLDN11	221541_at	CRISPLD2	203261_at	DCTN6

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
217973_at	DCXR	202116_at	DPF2	212375_at	EP400
208159_x_at	DDX11	215433_at	DPY19L1	217245_at	EPAG
208895_s_at	DDX18	205493_s_at	DPYSL4	207793_s_at	EPB41
219945_at	DDX25	206590_x_at	DRD2	222066_at	EPB41L1
215693_x_at	DDX27	216924_s_at	DRD2	212681_at	EPB41L3
219108_x_at	DDX27	216938_x_at	DRD2	204505_s_at	EPB49
203784_s_at	DDX28	202810_at	DRG1	205977_s_at	EPHA1
220890_s_at	DDX47	207324_s_at	DSC1	206852_at	EPHA7
200033_at	DDX5	215254_at	DSCR1	216680_s_at	EPHB4
219664_s_at	DECR2	205741_s_at	DTNA	202909_at	EPM2AIP1
214787_at	DENND4A	200035_at	DULLARD	209962_at	EPOR
202860_at	DENND4B	205348_s_at	DYNC1I1	218778_x_at	EPS8L1
205223_at	DEPDC5	211684_s_at	DYNC1I2	210930_s_at	ERBB2
217285_at	DGCR14	201999_s_at	DYNLT1	203719_at	ERCC1
201790_s_at	DHCR7	209033_s_at	DYRK1A	203720_s_at	ERCC1
201791_s_at	DHCR7	219551_at	EAF2	213468_at	ERCC2
211558_s_at	DHPS	202735_at	EBP	202414_at	ERCC5
214079_at	DHRS2	206217_at	EDA	211626_x_at	ERG
204815_s_at	DHX34	203279_at	EDEM1	201216_at	ERP29
214017_s_at	DHX34	207379_at	EDIL3	215095_at	ESD
209190_s_at	DIAPH1	204463_s_at	EDNRA	215096_s_at	ESD
216281_at	DICER1	209572_s_at	EED	204817_at	ESPL1
210819_x_at	DIO2	213087_s_at	EEF1D	38158_at	ESPL1
212503_s_at	DIP2C	216715_at	EEF1D	211235_s_at	ESR1
212504_at	DIP2C	211200_s_at	EFCAB2	210780_at	ESR2
222384_at	DKFZ564C16	201842_s_at	EFEMP1	211119_at	ESR2
221595_at	DKFZ564C23	209356_x_at	EFEMP2	207981_s_at	ESRRG
217220_at	DKFZ564C50	210132_at	EFNA3	219268_at	ETNK2
216874_at	DKFZ564C37	210984_x_at	EGFR	217061_s_at	ETV1
220512_at	DLC1	211607_x_at	EGFR	215510_at	ETV2
216856_s_at	DLEU2	219232_s_at	EGLN3	203780_at	EVA1
206489_s_at	DLGAP1	207484_s_at	EHMT2	208297_s_at	EVI5
207147_at	DLX2	204410_at	EIF1AY	210012_s_at	EWSR1
208216_at	DLX4	209429_x_at	EIF2B4	215417_at	EXOC6B
214304_x_at	DMN	212351_at	EIF2B5	212026_s_at	EXOC7
217067_s_at	DMP1	201144_s_at	EIF2S1	215413_at	EXOC7
213231_at	DMWD	201935_s_at	EIF4G3	215136_s_at	EXOSC8
215266_at	DNAH3	205994_at	ELK4	209537_at	EXTL2
200880_at	DNAJA1	206919_at	ELK4	205030_at	FABP7
203810_at	DNAJB4	214831_at	ELK4	216192_at	FABP7
203811_s_at	DNAJB4	214445_at	ELL2	208962_s_at	FADS1
202843_at	DNAJB9	203442_x_at	EML3	208963_x_at	FADS1
218976_at	DNAJC12	212969_x_at	EML3	208964_s_at	FADS1
212490_at	DNAJC8	204975_at	EMP2	218080_x_at	FAF1
215116_s_at	DNM1	221950_at	EMX2	221687_s_at	FAM125B
218457_s_at	DNMT3A	201341_at	ENC1	213166_x_at	FAM128A
220668_s_at	DNMT3B	206902_s_at	ENDOGL1	212995_x_at	FAM128B
202776_at	DNTTIP2	204845_s_at	ENPEP	217967_s_at	FAM129A
203187_at	DOCK1	204160_s_at	ENPP4	202916_s_at	FAM20B
213267_at	DOPEY1	221486_at	ENSA	202771_at	FAM38A
40612_at	DOPEY1	205757_at	ENTPD5	221774_x_at	FAM48A

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
217562_at	FAM5C	218842_at	FLJ21908	200008_s_at	GDI2
216044_x_at	FAM69A	220399_at	FLJ22639	219252_s_at	GEMIN8
219895_at	FAM70A	222378_at	FLJ43663	219821_s_at	GFOD1
216897_s_at	FAM76A	200859_x_at	FLNA	209919_x_at	GGT1
219438_at	FAM77C	214752_x_at	FLNA	207033_at	GIF
203805_s_at	FANCA	208614_s_at	FLNB	45633_at	GIN53
220255_at	FANCE	208748_s_at	FLOT1	218317_x_at	GIYD2
201911_s_at	FARP1	208749_x_at	FLOT1	40687_at	GJA4
212218_s_at	FASN	210142_x_at	FLOT1	214430_at	GLA
207835_at	FBLN1	219250_s_at	FLRT3	209276_s_at	GLRX
208988_at	FBXL11	1773_at	FNTB	203157_s_at	GLS
219208_at	FBXO11	209189_at	FOS	211414_at	GLS
212229_s_at	FBXO21	213260_at	FOXC1	217807_s_at	GLTSCR2
212231_at	FBXO21	220621_at	FOXEO3	217202_s_at	GLUL
220164_s_at	FBXO40	207658_s_at	FOXG1A	220393_at	GLULD1
211306_s_at	FCAR	202723_s_at	FOXO1A	212273_x_at	GNAS
211307_s_at	FCAR	217399_s_at	FOXO3B	214548_x_at	GNAS
211816_x_at	FCAR	215221_at	FOXP1	212294_at	GNG12
219927_at	FCF1	219889_at	FRAT1	207987_s_at	GNRH1
210992_x_at	FCGR2C	213056_at	FRMD4B	213206_at	GOSR2
211395_x_at	FCGR2C	222130_s_at	FTSJ2	206883_x_at	GP9
205283_at	FCMD	203988_s_at	FUT8	201618_x_at	GPAA1
207804_s_at	FCN2	201636_at	FXR1	211060_x_at	GPAA1
208647_at	FDFT1	217697_at	FYN	207174_at	GPC5
201275_at	FDPS	204452_s_at	FZD1	215387_x_at	GPC6
203116_s_at	FECH	209416_s_at	FZR1	220264_s_at	GPR107
204767_s_at	FEN1	203146_s_at	GABBR1	220265_at	GPR107
210521_s_at	FETUB	209990_s_at	GABBR2	221140_s_at	GPR132
204819_at	FGD1	216895_at	GABRG3	211659_at	GPR135
207501_s_at	FGF12	209304_x_at	GADD45B	211829_s_at	GPR30
207937_x_at	FGFR1	204121_at	GADD45G	207055_at	GPR37L1
222164_at	FGFR1	208155_x_at	GAGE6	208336_s_at	GPSN2
219612_s_at	FGG	208235_x_at	GAGE7	214611_at	GRIK1
204834_at	FGL2	206640_x_at	GAGE7B	212090_at	GRINA
201540_at	FHL1	216411_s_at	GALK2	204395_s_at	GRK5
40850_at	FKBP8	212256_at	GALNT10	202045_s_at	GRLF1
210926_at	FKSG30	218885_s_at	GALNT12	210234_at	GRM4
218974_at	FLJ10159	203398_s_at	GALNT3	218154_at	GSDMDC1
219525_at	FLJ10847	203179_at	GALT	215659_at	GSDML
220828_s_at	FLJ11292	220124_at	GAN	632_at	GSK3A
207489_at	FLJ12331	216967_at	GAP43	202451_at	GTF2H1
220715_at	FLJ12547	214869_x_at	GAPVD1	221540_x_at	GTF2H2
221335_x_at	FLJ12886	215162_at	GARNL1	205275_at	GTPBP1
219871_at	FLJ13197	210005_at	GART	216619_at	GTPBP10
213663_s_at	FLJ20152	203178_at	GATM	213621_s_at	GUK1
206860_s_at	FLJ20323	209093_s_at	GBA	211275_s_at	GYG1
218844_at	FLJ20920	210589_s_at	GBA	202947_s_at	GYPC
220723_s_at	FLJ21511	218912_at	GCC1	205524_s_at	HAPLN1
220724_at	FLJ21511	203500_at	GCDH	209252_at	HARS2
219965_s_at	FLJ21687	208369_s_at	GCDH	214414_x_at	HBA1
218480_at	FLJ21839	211020_at	GCNT2	216383_at	hCG_2040224

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
216227_at	HCG2P7	216735_x_at	HRH1	207687_at	INHBC
216174_at	HCRP1	221169_s_at	HRH4	208363_s_at	INPP4A
216176_at	HCRP1	221170_at	HRH4	213804_at	INPP5B
202455_at	HDAC5	203284_s_at	HS2ST1	213792_s_at	INSR
211722_s_at	HDAC6	213540_at	HSD17B8	202809_s_at	INTS3
211331_x_at	HFE	209513_s_at	HSDL2	218905_at	INTS8
211332_x_at	HFE	210211_s_at	HSP90AA1	200992_at	IPO7
204689_at	HHEX	211968_s_at	HSP90AA1	213392_at	IQCK
215316_at	HIBADH	211969_at	HSP90AA1	216135_at	IQCK
59999_at	HIF1AN	211538_s_at	HSPA2	214666_x_at	IREB2
219719_at	HIGD1B	214767_s_at	HSPB6	207403_at	IRS4
213833_x_at	HIGD2A	219998_at	HSPC159	220225_at	IRX4
208484_at	HIST1H1A	205133_s_at	HSPE1	222240_s_at	ISYNA1
207156_at	HIST1H2AG	201655_s_at	HSPG2	220590_at	ITFG2
214554_at	HIST1H2AL	209192_x_at	HTATIP	213416_at	ITGA4
214455_at	HIST1H2BC	207180_s_at	HTATIP2	216190_x_at	ITGB1
208490_x_at	HIST1H2BF	218475_at	HTF9C	221051_s_at	ITGB1BP3
214502_at	HIST1H2BJ	206786_at	HTN3	204628_s_at	ITGB3
208026_at	HIST1H4F	211616_s_at	HTR2A	211579_at	ITGB3
214562_at	HIST1H4L	216098_s_at	HTR7P	215240_at	ITGB3
220585_at	HKDC1	211152_s_at	HTRA2	204989_s_at	ITGB4
215217_at	HLA-C	215513_at	HYMAI	214021_x_at	ITGB5
216829_at	HLA-C	213878_at	IAPP	210888_s_at	ITIH1
217323_at	HLA-DRB6	215485_s_at	ICAM1	205755_at	ITIH3
209399_at	HLCS	201610_at	ICMT	203723_at	ITPKB
204753_s_at	HLF	201611_s_at	ICMT	211323_s_at	ITPR1
204754_at	HLF	213450_s_at	ICOSLG	216944_s_at	ITPR1
218152_at	HMG20A	201565_s_at	ID2	201187_s_at	ITPR3
209113_s_at	HMG20B	210045_at	IDH2	216495_x_at	IVD
210719_s_at	HMG20B	210046_s_at	IDH2	205889_s_at	JAKMIP2
216548_x_at	HMG4L	211782_at	IDS	219213_at	JAM2
206074_s_at	HMGA1	214569_at	IFNA5	202040_s_at	JARID1A
210457_x_at	HMGA1	202727_s_at	IFNGR1	220188_at	JPH3
204607_at	HMGCS2	211455_at	IFP38	206734_at	JRKL
204110_at	HNMT	202147_s_at	IFRD1	201015_s_at	JUP
204111_at	HNMT	203851_at	IGFBP6	208123_at	KCNB2
216559_x_at	HNRPA1	213910_at	IGFBP7	207103_at	KCND2
217353_at	HNRPA1	216318_at	IGHA1	207141_s_at	KCNJ3
205183_at	HNRPD	211646_at	IGHG3	221325_at	KCNK13
215489_x_at	HOMER3	216510_x_at	IGHM	205903_s_at	KCNN3
208604_s_at	HOXA3	217480_x_at	IGVCR518	204487_s_at	KCNQ1
206739_at	HOXC5	215121_x_at	IGL@	221889_at	KCTD13
205974_at	HOXD1	216984_x_at	IGL@	217894_at	KCTD3
207397_s_at	HOXD13	200066_at	IK	201978_s_at	KIAA0141
206601_s_at	HOXD3	207901_at	IL12B	212835_at	KIAA0157
203913_s_at	HPGD	206172_at	IL13RA2	212837_at	KIAA0157
211549_s_at	HPGD	217371_s_at	IL15	202650_s_at	KIAA0195
208470_s_at	HPR	221404_at	IL1F6	212474_at	KIAA0241
204544_at	HPS5	207526_s_at	IL1RL1	216278_at	KIAA0256
219984_s_at	HRASLS	221271_at	IL21	210111_s_at	KIAA0265
31835_at	HRG	214493_s_at	INADL	205496_at	KIAA0408

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
204302_s_at	KIAA0427	211651_s_at	LAMB1	205282_at	LRP8
204303_s_at	KIAA0427	209270_at	LAMB3	211615_s_at	LRPPRC
202386_s_at	KIAA0430	215516_at	LAMB4	220376_at	LRRC19
201776_s_at	KIAA0494	200770_s_at	LAMC1	218550_s_at	LRRC20
205151_s_at	KIAA0644	208117_s_at	LAS1L	211353_at	LRRC21
201683_x_at	KIAA0737	208885_at	LCP1	218907_s_at	LRRC61
217448_s_at	KIAA0737	205269_at	LCP2	216167_at	LRRN2
212814_at	KIAA0828	210948_s_at	LEF1	220345_at	LRRTM4
204568_at	KIAA0831	202594_at	LEPROTL1	202737_s_at	LSM4
217652_at	KIAA0892	219699_at	LGI2	211019_s_at	LSS
213913_s_at	KIAA0984	218253_s_at	LGTN	216388_s_at	LTB4R
221874_at	KIAA1324	206230_at	LHX1	204442_x_at	LTBP4
221233_s_at	KIAA1411	219884_at	LHX6	213176_s_at	LTBP4
222139_at	KIAA1466	205876_at	LIFR	206584_at	LY96
214723_x_at	KIAA1641	202726_at	LIG1	210044_s_at	LYL1
215673_at	KIAA1655	220765_s_at	LIMS2	210943_s_at	LYST
215943_at	KIAA1661	220121_at	LINS1	207343_at	LYZL6
220340_at	KIAA1772	211562_s_at	LMOD1	203412_at	LZTR1
221070_s_at	KIAA1967	207904_s_at	LNPEP	210303_at	MAB21L2
202183_s_at	KIF22	216386_at	LOC220077	208633_s_at	MACF1
220002_at	KIF26B	222368_at	LOC389634	218969_at	Magmas
203087_s_at	KIF2A	216731_s_at	LOC389768	210093_s_at	MAGOH
205664_at	KIN	212999_x_at	LOC390569	209166_s_at	MAN2B1
211687_x_at	KIR3DL1	212578_x_at	LOC402057	203668_at	MAN2C1
207029_at	KITLG	215627_at	LOC440925	202424_at	MAP2K2
209211_at	KLF5	60815_at	LOC441257	213490_s_at	MAP2K2
217906_at	KLHDC2	221195_at	LOC51136	210482_x_at	MAP2K5
210307_s_at	KLHL25	212114_at	LOC552889	211370_s_at	MAP2K5
221221_s_at	KLHL3	220770_s_at	LOC63920	204089_x_at	MAP3K4
213117_at	KLHL9	222347_at	LOC644450	219278_at	MAP3K6
209855_s_at	KLK2	215610_at	LOC644974	206040_s_at	MAPK11
204582_s_at	KLK3	217239_x_at	LOC652102	210449_x_at	MAPK14
222242_s_at	KLK5	214110_s_at	LOC654342	211561_x_at	MAPK14
220646_s_at	KLRF1	214101_s_at	LOC728896	212046_x_at	MAPK3
202055_at	KPNA1	222249_at	LOC730259	213178_s_at	MAPK8IP3
206241_at	KPNA5	208107_s_at	LOC81691	221560_at	MARK4
204010_s_at	KRAS	210450_at	LOC90925	214363_s_at	MATR3
203203_s_at	KRR1	213502_x_at	LOC91316	209623_at	MCCC2
207935_s_at	KRT13	215196_at	LOC91316	217004_s_at	MCF2
217333_at	KRT18	213220_at	LOC92482	214056_at	MCL1
207908_at	KRT2	216666_at	LOC93432	215580_at	MCM3AP
220267_at	KRT24	210102_at	LOC11012A	208795_s_at	MCM7
217325_at	KRT3	202999_s_at	LOXL2	210983_s_at	MCM7
206677_at	KRT31	207584_at	LPA	218163_at	MCTS1
201003_x_at	Kua-UEV	202822_at	LPP	219348_at	MDS032
210662_at	KYNU	218509_at	LPPR2	210153_s_at	ME2
204585_s_at	L1CAM	212692_s_at	LRBA	216071_x_at	MED12
206486_at	LAG3	204692_at	LRCH4	212032_s_at	MED25
207509_s_at	LAIR2	221956_at	LRCH4	202016_at	MEST
210089_s_at	LAMA4	200785_s_at	LRP1	212673_at	METAP1
210989_at	LAMA4	214873_at	LRP5L	209861_s_at	METAP2

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
213899_at	METAP2	211783_s_at	MTA1	215859_at	NCLN
204027_s_at	METTL1	204956_at	MTAP	205732_s_at	NCOA2
220839_at	METTL5	210212_x_at	MTCP1	200632_s_at	NDRG1
211424_x_at	METTL7A	216862_s_at	MTCP1	215850_s_at	NDUFA5
203406_at	MFAP1	204871_at	MTERF	217352_at	NDUFB3P5
214588_s_at	MFAP3	214364_at	MTERFD2	211407_at	NDUFB7
210603_at	MGC10646	217070_at	MTHFR	217585_at	NEBL
211775_x_at	MGC13053	203433_at	MTHFS	206089_at	NELL1
51774_s_at	MGC13098	203212_s_at	MTMR2	214072_x_at	NENF
218641_at	MGC3032	211507_s_at	MTMR3	208926_at	NEU1
220930_s_at	MGC5590	215793_at	MTMR7	204889_s_at	NEURL
219332_at	MICALL2	203037_s_at	MTSS1	212676_at	NF1
218251_at	MID1IP1	204895_x_at	MUC4	210767_at	NF2
221863_at	MIER2	217110_s_at	MUC4	208196_x_at	NFATC1
209241_x_at	MINK1	214385_s_at	MUC5AC	211466_at	NFIB
215909_x_at	MINK1	217182_at	MUC5AC	211467_s_at	NFIB
204305_at	MIPEP	217187_at	MUC5AC	210268_at	NFX1
206585_at	MKRN3	221290_s_at	MUM1	214497_s_at	NHLH2
213395_at	MLC1	207632_at	MUSK	221836_s_at	NIBP
204784_s_at	MLF1	203027_s_at	MVD	201591_s_at	NISCH
211826_s_at	MLL	204056_s_at	MVK	202891_at	NIT1
217075_x_at	MLL4	215649_s_at	MVK	215339_at	NKTR
216506_x_at	MLLT10	221250_s_at	MXD3	207703_at	NLGN4Y
203434_s_at	MME	212346_s_at	MXD4	216016_at	NLRP3
207013_s_at	MMP16	201710_at	MYBL2	217709_at	NMT2
204259_at	MMP7	217660_at	MYH14	202237_at	NNMT
219091_s_at	MMRN2	205940_at	MYH3	202784_s_at	NNT
205330_at	MN1	204737_s_at	MYH7	220066_at	NOD2
201299_s_at	MOBK1B	205589_at	MYL3	221970_s_at	NOL11
211673_s_at	MOCS1	210088_x_at	MYL4	200875_s_at	NOL5A
212754_s_at	MON2	218926_at	MYNN	210098_s_at	NOL7
220850_at	MORC1	215074_at	MYO1B	222080_s_at	NOL7
217982_s_at	MORF4L1	212338_at	MYO1D	218754_at	NOL9
219070_s_at	MOSPD3	216660_at	MYO7B	210470_x_at	NONO
205079_s_at	MPDZ	205610_at	MYOM1	214321_at	NOV
203686_at	MPG	219728_at	MYOT	207217_s_at	NOX1
206186_at	MPP3	216361_s_at	MYST3	207380_x_at	NOX1
215919_s_at	MRPS11	40569_at	MZF1	205459_s_at	NPAS2
213840_s_at	MRPS12	211139_s_at	NAB1	205460_at	NPAS2
218982_s_at	MRPS17	202944_at	NAGA	213462_at	NPAS2
208907_s_at	MRPS18B	208754_s_at	NAP1L1	207673_at	NPHS1
220103_s_at	MRPS18C	219217_at	NARS2	221210_s_at	NPL
218654_s_at	MRPS33	201969_at	NASP	203814_s_at	NQO2
217942_at	MRPS35	214440_at	NAT1	206644_at	NR0B1
219607_s_at	MS4A4A	210874_s_at	NAT6	206410_at	NR0B2
212913_at	MSH5	216632_at	NAV3	218215_s_at	NR1H2
204885_s_at	MSLN	201621_at	NBL1	208388_at	NR2E3
207430_s_at	MSMB	37005_at	NBL1	205259_at	NR3C2
205556_at	MSX2	209519_at	NCBP1	202340_x_at	NR4A1
210319_x_at	MSX2	217465_at	NCKAP1	215104_at	NRIP2
202247_s_at	MTA1	216114_at	NCKIPSD	209483_s_at	NSL1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
219458_s_at	NSUN3	208644_at	PARP1	219606_at	PHF20L1
208605_s_at	NTRK1	219034_at	PARP16	203278_s_at	PHF21A
215824_at	NUDT7	202239_at	PARP4	209439_s_at	PHKA2
202184_s_at	NUP133	209494_s_at	PATZ1	205281_s_at	PIGA
212247_at	NUP205	214090_at	PAWR	214991_s_at	PIGO
202155_s_at	NUP214	221969_at	PAX5	217872_at	PIH1D1
218294_s_at	NUP50	221990_at	PAX8	215212_at	PIK3CA
215213_at	NUP54	221212_x_at	PB1	206369_s_at	PIK3CG
210793_s_at	NUP98	204031_s_at	PCBP2	207105_s_at	PIK3R2
204435_at	NUPL1	203860_at	PCCA	211580_s_at	PIK3R3
204003_s_at	NUPL2	212694_s_at	PCCB	216436_at	PIK3R4
219100_at	OBFC1	210292_s_at	PCDH11X	207081_s_at	PIK4CA
219334_s_at	OBFC2A	205535_s_at	PCDH7	204571_x_at	PIN4
218903_s_at	OBFC2B	214563_at	PCDHGC3	204572_s_at	PIN4
220959_s_at	OBP2B	203660_s_at	PCNT	214224_s_at	PIN4
209925_at	OCLN	220461_at	PCNXL2	209019_s_at	PINK1
201282_at	OGDH	202465_at	PCOLCE	201190_s_at	PITPNA
207563_s_at	OGT	205559_s_at	PCSK5	202522_at	PITPNB
205907_s_at	OMD	205560_at	PCSK5	219155_at	PITPNC1
217302_at	OR2F2	210907_s_at	PDCD10	203826_s_at	PITPNM1
216818_s_at	OR2J2	222152_at	PDCD6	202327_s_at	PKD1
216690_at	OR7A5	204449_at	PDCL	202161_at	PKN1
203351_s_at	ORC4L	219043_s_at	PDCL3	204196_x_at	PKNOX1
204957_at	ORC5L	211751_at	PDE4DIP	221883_at	PKNOX1
205040_at	ORM1	212521_s_at	PDE8A	222185_at	PKNOX2
201799_s_at	OSBP	205226_at	PDGFRL	205724_at	PKP1
221237_s_at	OSBP2	202590_s_at	PDK2	206311_s_at	PLA2G1B
210344_at	OSBPL7	221957_at	PDK3	221389_at	PLA2G2E
222337_at	OSBPL9	205960_at	PDK4	221416_at	PLA2G2F
220669_at	OTUD4	209621_s_at	PDLIM3	210647_x_at	PLA2G6
208338_at	P2RX3	210170_at	PDLIM3	209533_s_at	PLAA
207091_at	P2RX7	221244_s_at	PDPK1	219702_at	PLAC1
218589_at	P2RY5	204879_at	PDPN	204046_at	PLCB2
207543_s_at	P4HA1	221898_at	PDPN	205125_at	PLCD1
220402_at	P53AIP1	219630_at	PDZK1IP1	216634_at	PLCH1
213046_at	PABPN1	217923_at	PEF1	205934_at	PLCL1
212778_at	PACS2	218319_at	PELI1	215723_s_at	PLD1
220962_s_at	PADI1	55616_at	PERLD1	215724_at	PLD1
211412_at	PADI4	215023_s_at	PEX1	209978_s_at	PLG
211413_s_at	PADI4	203244_at	PEX5	217265_at	PLLP
200815_s_at	PAFAH1B1	204545_at	PEX6	204940_at	PLN
205564_at	PAGE4	320_at	PEX6	201136_at	PLP2
205719_s_at	PAH	211033_s_at	PEX7	203623_at	PLXNA3
209615_s_at	PAK1	214388_at	PFAAP5	215807_s_at	PLXNB1
208875_s_at	PAK2	204992_s_at	PFN2	211472_at	PLXNB2
203154_s_at	PAK4	217009_at	PGK1	206471_s_at	PLXNC1
33814_at	PAK4	210041_s_at	PGM3	206942_s_at	PMCH
221941_at	PAOX	208491_s_at	PGM5	221022_s_at	PMFBP1
222282_at	PAPD4	208305_at	PGR	215410_at	PMS2L2
219236_at	PAQR6	218338_at	PHC1	215412_x_at	PMS2L2
213204_at	PARC	218517_at	PHF17	215192_at	PMS2L4

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
218961_s_at	PNKP	213847_at	PRPH	200927_s_at	RAB14
217343_at	PNLIPRP2	218714_at	PRR14	200928_s_at	RAB14
209597_s_at	PNMA2	205515_at	PRSS12	218186_at	RAB25
209739_s_at	PNPLA4	210988_s_at	PRUNE	208730_x_at	RAB2A
203718_at	PNPLA6	208332_at	PRY	211471_s_at	RAB36
203422_at	POLD1	200866_s_at	PSAP	216057_at	RAB3GAP2
202996_at	POLD4	206523_at	PSCD3	215956_at	RAB5A
208828_at	POLE3	204261_s_at	PSEN2	219210_s_at	RAB8B
202725_at	POLR2A	203399_x_at	PSG3	203223_at	RABEP1
202634_at	POLR2K	205961_s_at	PSIP1	213970_at	RABL3
205218_at	POLR3F	222286_at	PSIP1	206103_at	RAC3
217944_at	POMGNT1	201676_x_at	PSMA1	222077_s_at	RACGAP1
217769_s_at	POMP	210759_s_at	PSMA1	211228_s_at	RAD17
211341_at	POU4F1	211746_x_at	PSMA1	201039_s_at	RAD23A
220741_s_at	PPA2	201316_at	PSMA2	210255_at	RAD51L1
209434_s_at	PPAT	204219_s_at	PSMC1	204916_at	RAMP1
214146_s_at	PPBP	201067_at	PSMC2	206220_s_at	RASA3
210236_at	PPFIA1	201699_at	PSMC6	212706_at	RASA4
203735_x_at	PPFIBP1	208776_at	PSMD11	217194_at	RASAL2
217602_at	PPIA	212296_at	PSMD14	217201_at	RASAL2
203063_at	PPM1F	210460_s_at	PSMD4	219026_s_at	RASAL2
37384_at	PPM1F	211609_x_at	PSMD4	214368_at	RASGRP2
212686_at	PPM1H	211271_x_at	PTBP1	220680_at	RAVER2
218273_s_at	PPM2C	210833_at	PTGER3	211540_s_at	RB1
217841_s_at	PPME1	210834_s_at	PTGER3	202033_s_at	RB1CC1
201407_s_at	PPP1CB	211265_at	PTGER3	219214_s_at	RBAK
202187_s_at	PPP2R5A	206187_at	PTGIR	212332_at	RBL2
201877_s_at	PPP2R5C	210355_at	PTHLH	208984_x_at	RBM10
202429_s_at	PPP3CA	205911_at	PTHR1	217221_x_at	RBM10
206174_s_at	PPP6C	206482_at	PTK6	204178_s_at	RBM14
209826_at	PPT2	218045_x_at	PTMS	219286_s_at	RBM15
213483_at	PPWD1	216988_s_at	PTP4A2	218134_s_at	RBM22
214527_s_at	PQBP1	206574_s_at	PTP4A3	214942_at	RBM34
220453_at	PQLC2	217689_at	PTPN1	213852_at	RBM8A
218329_at	PRDM4	204935_at	PTPN2	217856_at	RBM8A
221151_at	PRDM9	203997_at	PTPN3	216215_s_at	RBM9
211658_at	PRDX2	203029_s_at	PTPRN2	208307_at	RBMY1A1
200845_s_at	PRDX6	203030_s_at	PTPRN2	222049_s_at	RBP4
205628_at	PRIM2A	206084_at	PTPRR	207836_s_at	RBPMS
215708_s_at	PRIM2A	204469_at	PTPRZ1	218117_at	RBX1
202741_at	PRKACB	218732_at	PTRH2	210106_at	RDH5
213052_at	PRKAR2A	213806_at	PURA	213520_at	RECQL4
213093_at	PRKCA	220860_at	PURG	210309_at	RECQL5
214080_x_at	PRKCSH	221277_s_at	PUS3	200938_s_at	RERE
205880_at	PRKD1	221025_x_at	PUS7L	204536_s_at	REST
208694_at	PRKDC	32699_s_at	PVR	209084_s_at	RFC1
210543_s_at	PRKDC	219076_s_at	PXMP2	207934_at	RFPL1
216072_at	PRMT2	214541_s_at	QKI	214000_s_at	RGS10
220479_at	PRO0132	218948_at	QRSL1	209638_x_at	RGS12
209384_at	PROSC	217793_at	RAB11B	204337_at	RGS4
202251_at	PRPF3	203883_s_at	RAB11FIP2	209071_s_at	RGS5

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
211446_at	RGSL2	201094_at	RPS29	215204_at	SENP6
204402_at	RHBDD3	204906_at	RPS6KA2	214720_x_at	SEPT10
219202_at	RHBDF2	212912_at	RPS6KA2	217721_at	SEPT7
212099_at	RHOB	204635_at	RPS6KA5	207425_s_at	SEPT9
65770_at	RHOT2	216815_at	RPSA	208657_s_at	SEPT9
220282_at	RIC3	217411_s_at	RREB1	221472_at	SERINC3
214663_at	RIPK5	207363_at	RS1	206386_at	SERPINA7
222042_x_at	RKHD1	214583_at	RSC1A1	205352_at	SERPINI1
205158_at	RNASE4	211526_s_at	RTEL1	201357_s_at	SF3A1
212724_at	RND3	210222_s_at	RTN1	209381_x_at	SF3A2
221063_x_at	RNF123	211181_x_at	RUNX1	37462_i_at	SF3A2
222349_x_at	RNF126P1	205528_s_at	RUNX1T1	201071_x_at	SF3B1
222058_at	RNF130	36129_at	RUTBC1	202037_s_at	SFRP1
221273_s_at	RNF208	209148_at	RXRB	208673_s_at	SFRS3
210706_s_at	RNF24	215099_s_at	RXRB	35626_at	SGSH
217642_at	RNF40	202598_at	S100A13	209322_s_at	SH2B1
210931_at	RNF6	217728_at	S100A6	205367_at	SH2B2
218301_at	RNPEPL1	203535_at	S100A9	205728_at	SH2D1A
206419_at	RORC	214967_at	SAMD4A	210116_at	SH2D1A
212946_at	RP11-25A73	220367_s_at	SAP130	211210_x_at	SH2D1A
212370_x_at	RP11-56A21.1	213963_s_at	SAP30	213633_at	SH3BP1
215861_at	RP47-21E162	217928_s_at	SAPS3	204019_s_at	SH3YL1
207107_at	RPE65	201542_at	SAR1A	56256_at	SIDT2
200036_s_at	RPL10A	201543_s_at	SAR1A	52940_at	SIGIRR
208929_x_at	RPL13	211322_s_at	SARDH	206558_at	SIM2
200715_x_at	RPL13A	213988_s_at	SAT1	209352_s_at	SIN3B
211942_x_at	RPL13A	213435_at	SATB2	220047_at	SIRT4
200022_at	RPL18	222084_s_at	SBF1	210792_x_at	SIVA1
214335_at	RPL18	218737_at	SBNO1	206675_s_at	SKIL
200869_at	RPL18A	215064_at	SC5DL	200718_s_at	SKP1A
201217_x_at	RPL3	213244_at	SCAMP4	219386_s_at	SLAMF8
211073_x_at	RPL3	206884_s_at	SCEL	211112_at	SLC12A4
211666_x_at	RPL3	205979_at	SCGB2A1	210040_at	SLC12A5
212039_x_at	RPL3	222272_x_at	SCIN	207254_at	SLC15A1
215963_x_at	RPL3	210853_at	SCN11A	205317_s_at	SLC15A2
221593_s_at	RPL31	210383_at	SCN1A	213522_s_at	SLC16A3
217155_at	RPL34P2	205508_at	SCN1B	205234_at	SLC16A4
200002_at	RPL35	208458_at	SCNN1D	204229_at	SLC17A7
219762_s_at	RPL36	218217_at	SCPEP1	205857_at	SLC18A2
202028_s_at	RPL38	210918_at	SCRG1	209775_x_at	SLC19A1
221943_x_at	RPL38	200958_s_at	SDCBP	220736_at	SLC19A3
213689_x_at	RPL5	209206_at	SEC22B	209611_s_at	SLC1A4
201033_x_at	RPLP0	209207_s_at	SEC22B	210923_at	SLC1A7
208856_x_at	RPLP0	214257_s_at	SEC22B	220100_at	SLC22A11
211972_x_at	RPLP0	209175_at	SEC23IP	210420_at	SLC24A1
200908_s_at	RPLP2	206805_at	SEMA3A	211842_s_at	SLC24A1
203436_at	RPP30	206941_x_at	SEMA3E	210010_s_at	SLC25A1
215743_at	RPP38	208124_s_at	SEMA4F	207088_s_at	SLC25A11
213350_at	RPS11	215028_at	SEMA6A	218653_at	SLC25A15
201258_at	RPS16	208100_x_at	SEMA6C	211754_s_at	SLC25A17
202648_at	RPS19	202319_at	SENP6	212085_at	SLC25A6

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
212826_s_at	SLC25A6	202114_at	SNX2	206258_at	ST8SIA5
205097_at	SLC26A2	217789_at	SNX6	208194_s_at	STAM2
206529_x_at	SLC26A4	209253_at	SORBS3	221610_s_at	STAP2
207249_s_at	SLC28A2	201563_at	SORD	208991_at	STAT3
218494_s_at	SLC2A4RG	217576_x_at	SOS2	208992_s_at	STAT3
202614_at	SLC30A9	217644_s_at	SOS2	212549_at	STAT5B
203306_s_at	SLC35A1	213722_at	SOX2	202558_s_at	STCH
218928_s_at	SLC37A1	201416_at	SOX4	202694_at	STK17A
219215_s_at	SLC39A4	201417_at	SOX4	203001_s_at	STMN2
219869_s_at	SLC39A8	210985_s_at	SP100	201060_x_at	STOM
207056_s_at	SLC4A8	205406_s_at	SPA17	201061_s_at	STOM
205920_at	SLC6A6	220982_s_at	SPACA1	215416_s_at	STOML2
207043_s_at	SLC6A9	208045_at	SPAR	217903_at	STRN4
212295_s_at	SLC7A1	221057_at	SPATA1	212631_at	STX7
206354_at	SLCO1B3	204434_at	SPATA2	212459_x_at	SUCLG2
210542_s_at	SLCO3A1	219583_s_at	SPATA7	214835_s_at	SUCLG2
209897_s_at	SLIT2	213441_x_at	SPDEF	215048_at	SUHW2
214536_at	SLURP1	214404_x_at	SPDEF	214712_at	SULT1A4
213089_at	SMA5	220192_x_at	SPDEF	216556_x_at	SUMO1
215043_s_at	SMA5	212526_at	SPG20	201483_s_at	SUPT4H1
203874_s_at	SMARCA1	205312_at	SPI1	212894_at	SUPV3L1
206543_at	SMARCA2	211567_at	SPN	209362_at	SURB7
217656_at	SMARCA4	202523_s_at	SPOCK2	219389_at	SUSD4
202303_x_at	SMARCA5	215833_s_at	SPPL2B	203069_at	SV2A
213859_x_at	SMARCA5	46256_at	SPSB3	32402_s_at	SYMPK
212167_s_at	SMARCB1	212071_s_at	SPTBN1	202761_s_at	SYNE2
203183_s_at	SMARCD1	209218_at	SQLE	201079_at	SYNGR2
216358_at	SMARCE1	213562_s_at	SQLE	206719_at	SYNGR4
222270_at	SMEK2	212060_at	SR140	201260_s_at	SYPL1
210057_at	SMG1	212275_s_at	SRCAP	203999_at	SYT1
212921_at	SMYD2	218800_at	SRD5A2L	200911_s_at	TACC1
212922_s_at	SMYD2	201247_at	SREBF2	202287_s_at	TACSTD2
209516_at	SMYD5	201248_s_at	SREBF2	211221_at	TADA3L
202508_s_at	SNAP25	202401_s_at	SRF	215272_at	TADA3L
204104_at	SNAPC2	203605_at	SRP54	205966_at	TAF13
214592_s_at	SNAPC5	218140_x_at	SRPRB	203937_s_at	TAF1C
204466_s_at	SNCA	207435_s_at	SRRM2	202168_at	TAF9
204467_s_at	SNCA	202591_s_at	SSBP1	204878_s_at	TAOK2
219409_at	SNIP1	217991_x_at	SSBP3	216298_at	TARP
215917_at	SNPH	202506_at	SSFA2	221189_s_at	TARS2
213121_at	SNRP70	219241_x_at	SSH3	221392_at	TAS2R4
201770_at	SNRPA	219919_s_at	SSH3	203977_at	TAZ
202505_at	SNRPB2	51192_at	SSH3	37278_at	TAZ
202690_s_at	SNRPD1	213921_at	SST	218466_at	TBC1D17
202691_at	SNRPD1	208482_at	SSTR1	216549_s_at	TBC1D22B
215450_at	SNRPE	214970_s_at	ST6GAL1	213787_s_at	TBC1D25
205644_s_at	SNRPG	220937_s_at	ST6GALNAC4	215994_x_at	TBC1D9B
214834_at	SNRPN	221551_x_at	ST6GALNAC4	222356_at	TBL1Y
203516_at	SNTA1	215362_at	ST8SIA2	206838_at	TBX19
208608_s_at	SNTB1	221285_at	ST8SIA2	200711_s_at	TCEB1P
53912_at	SNX11	208065_at	ST8SIA3	220844_at	TCEB3B

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
221016_s_at	TCF7L1	222246_at	TMSB10	210373_at	TUSC4
204849_at	TCFL5	214009_at	TMSB4X	214729_at	TWISTNB
219840_s_at	TCL6	210643_at	TNFSF11	206828_at	TXK
203743_s_at	TDG	221085_at	TNFSF15	208864_s_at	TXN
206286_s_at	TDGF1	205388_at	TNNC2	216609_at	TXN
219715_s_at	TDP1	205177_at	TNNI1	201581_at	TXNDC13
204281_at	TEAD4	217460_at	TNP2	203008_x_at	TXNDC9
206702_at	TEK	216845_x_at	TNRC21	210803_at	TXNRD2
205727_at	TEP1	206817_x_at	TNRC4	205546_s_at	TYK2
205486_at	TESK2	200662_s_at	TOMM20	202589_at	TYMS
221035_s_at	TEX14	212773_s_at	TOMM20	205694_at	TYRP1
209676_at	TFPI	212883_at	TOMM40	218347_at	TYW1
213258_at	TFPI	201512_s_at	TOMM70A	202151_s_at	UBADC1
209277_at	TFPI2	201746_at	TP53	218340_s_at	UBE1L2
209278_s_at	TFPI2	217914_at	TPCN1	202335_s_at	UBE2B
201042_at	TGM2	221218_s_at	TPK1	208760_at	UBE2I
217566_s_at	TGM4	214365_at	TPM3	217825_s_at	UBE2J1
220360_at	THAP9	215796_at	TRA@	217978_s_at	UBE2Q1
219800_s_at	THNSL1	217065_at	TRA@	215558_at	UBR2
216109_at	THRAP2	221571_at	TRAF3	212006_at	UBXD2
219248_at	THUMPD2	35254_at	TRAFD1	212108_at	UBXD8
202405_at	TIAL1	201391_at	TRAP1	219960_s_at	UCHL5
203046_s_at	TIMELESS	219351_at	TRAPPC2	221384_at	UCP1
215171_s_at	TIMM17A	212872_s_at	TRFP	218050_at	UFM1
219258_at	TIPIN	206622_at	TRH	218801_at	UGCGL2
210673_x_at	TITF1	218403_at	TRIAP1	221708_s_at	UNC45A
211024_s_at	TITF1	210885_s_at	TRIM15	206189_at	UNC5C
215428_at	TJP1	204390_at	TRIM24	212144_at	UNC84B
208699_x_at	TKT	221897_at	TRIM52	214640_at	UNC93A
214183_s_at	TKTL1	205028_at	TRO	214624_at	UPK1A
40837_at	TLE2	214824_at	TRPC1	210064_s_at	UPK1B
216997_x_at	TLE4	221102_s_at	TRPM6	207862_at	UPK2
210379_s_at	TLK1	203578_s_at	TRPV6	209065_at	UQCRB
211077_s_at	TLK1	218977_s_at	TRSPAP1	216173_at	URG4
215843_s_at	TLL2	215735_s_at	TSC2	222074_at	UROD
212701_at	TLN2	210953_at	TSC22D2	202152_x_at	USF2
208943_s_at	TLOC1	207001_x_at	TSC22D3	215737_x_at	USF2
221060_s_at	TLR4	215637_at	TSGA14	205356_at	USP13
207410_s_at	TLX2	222220_s_at	TSNAXIP1	216957_at	USP22
206242_at	TM4SF5	201434_at	TTC1	220370_s_at	USP36
220021_at	TMC7	218972_at	TTC17	221098_x_at	UTP14A
208716_s_at	TMCO1	200855_at	TTC19	218715_at	UTP6
212682_s_at	TMEM112B	215106_at	TTC22	220784_s_at	UTS2
215508_at	TMEM113	213679_at	TTC30A	203990_s_at	UTX
221622_s_at	TMEM126B	218838_s_at	TTC31	207101_at	VAMP1
217613_at	TMEM144	205652_s_at	TTLL1	203940_s_at	VASH1
220169_at	TMEM156	216251_s_at	TTLL12	205536_at	VAV2
218745_x_at	TMEM161A	217429_at	TTLL2	201472_at	VBP1
212164_at	TMEM183A	201714_at	TUBG1	200930_s_at	VCL
218770_s_at	TMEM39B	202477_s_at	TUBGCP2	219810_at	VCIPI1
212202_s_at	TMEM87A	213563_s_at	TUBGCP2	215729_s_at	VGLL1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
218396_at	VPS13C	221608_at	WNT6	222016_s_at	ZNF323
220517_at	VPS13C	210301_at	XDH	213760_s_at	ZNF330
212326_at	VPS13D	220037_s_at	XLKD1	220022_at	ZNF334
203459_s_at	VPS16	208317_at	XYLB	78330_at	ZNF335
201807_at	VPS26A	213725_x_at	XYLT1	206096_at	ZNF35
218679_s_at	VPS28	200638_s_at	YWHAZ	221123_x_at	ZNF395
216067_at	VPS35	218263_s_at	ZBED5	205514_at	ZNF415
217727_x_at	VPS35	205340_at	ZBTB24	205964_at	ZNF426
219794_at	VPS53	220118_at	ZBTB32	206695_x_at	ZNF43
218731_s_at	VWA1	213323_s_at	ZC3H7B	218707_at	ZNF444
212264_s_at	WAPAL	212704_at	ZCCHC11	216279_at	ZNF460
200628_s_at	WARS	218478_s_at	ZCCHC8	211923_s_at	ZNF471
216094_at	WASL	219779_at	ZFHX4	211064_at	ZNF493
209117_at	WBP2	208199_s_at	ZFP161	203322_at	ZNF508
218512_at	WDR12	209724_s_at	ZFP161	215307_at	ZNF529
222138_s_at	WDR13	207757_at	ZFP2	215124_at	ZNF550
209461_x_at	WDR18	217367_s_at	ZHX3	211721_s_at	ZNF551
201886_at	WDR23	206373_at	ZIC1	206648_at	ZNF571
214662_at	WDR43	211463_at	ZIC4	207219_at	ZNF643
221735_at	WDR48	206652_at	ZMYM5	216468_s_at	ZNF682
201421_s_at	WDR77	216350_s_at	ZNF10	220661_s_at	ZNF692
212533_at	WEE1	214741_at	ZNF131	208273_at	ZNF695
209054_s_at	WHSC1	206182_at	ZNF134	213658_at	ZNF710
212050_at	WIPF2	206142_at	ZNF135	214813_at	ZNF75
216006_at	WIPF2	204474_at	ZNF142	219995_s_at	ZNF750
214699_x_at	WIPI2	217242_at	ZNF154	214899_at	ZNF780B
39313_at	WNK1	205497_at	ZNF175	215570_s_at	ZNF780B
206213_at	WNT10B	203585_at	ZNF185	207272_at	ZNF80
213425_at	WNT5A	220214_at	ZNF215	219676_at	ZSCAN16
		220055_at	ZNF287	215636_at	ZUBR1

Tab. VII: regulierte Gene nach FRA1 siRNA vermittelte Inhibition in HA1ER, P-Wert < 0,05

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
201000_at	AARS	217419_x_at	AGRN	212348_s_at	AOF2
205142_x_at	ABCD1	204551_s_at	AHSG	217174_s_at	APC2
216113_at	ABI2	206513_at	AIM2	220023_at	APOB48R
214671_s_at	ABR	219308_s_at	AK5	39249_at	AQP3
205156_s_at	ACCN2	203847_s_at	AKAP8	208750_s_at	ARF1
209600_s_at	ACOX1	211004_s_at	ALDH3B1	203264_s_at	ARHGEF9
209601_at	ACOX1	219374_s_at	ALG9	202091_at	ARL2BP
208013_s_at	ACRV1	205621_at	ALKBH1	202641_at	ARL3
213214_x_at	ACTG1	207381_at	ALOX12B	213561_at	ASF1A
221607_x_at	ACTG1	216377_x_at	ALPPL2	206030_at	ASPA
211238_at	ADAM7	209424_s_at	AMACR	204998_s_at	ATF5
209320_at	ADCY3	217113_at	AMACR	208871_at	ATN1
201792_at	AEBP1	204976_s_at	AMMECR1	212361_s_at	ATP2A2
215535_s_at	AGPAT1	205141_at	ANG	202325_s_at	ATP5J
32836_at	AGPAT1	213099_at	ANGEL1	205095_s_at	ATP6V0A1
215409_at	AGPAT7	220280_s_at	ANKMY1	200078_s_at	ATP6V0B
40472_at	AGPAT7	221522_at	ANKRD27	201171_at	ATP6V0E1
212285_s_at	AGRN	213035_at	ANKRD28	201972_at	ATP6V1A

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
201089_at	ATP6V1B2	217128_s_at	CAMK1G	204136_at	COL7A1
202874_s_at	ATP6V1C1	218309_at	CAMK2N1	217312_s_at	COL7A1
216391_s_at	ATXN8OS	219365_s_at	CAMKV	201441_at	COX6B1
204092_s_at	AURKA	212948_at	CAMTA2	201256_at	COX7A2L
214575_s_at	AZU1	208374_s_at	CAPZA1	206368_at	CPLX2
211631_x_at	B4GALT1	218384_at	CARHSP1	215700_x_at	CPNE6
204966_at	BAI2	212971_at	CARS	205843_x_at	CRAT
203728_at	BAK1	207620_s_at	CASK	209522_s_at	CRAT
208132_x_at	BAT2	212816_s_at	CBS	207715_at	CRYGB
212081_x_at	BAT2	58994_at	CC2D1A	211287_x_at	CSF2RA
214201_x_at	BAT2	220308_at	CCDC19	215946_x_at	CTA24B1
205965_at	BATF	220908_at	CCDC33	201906_s_at	CTDSPL
218332_at	BEX1	206988_at	CCL25	214450_at	CTSW
210202_s_at	BIN1	214638_s_at	CCNT2	206775_at	CUBN
214643_x_at	BIN1	219025_at	CD248	36084_at	CUL7
208292_at	BMP10	204118_at	CD48	202367_at	CUTL1
209590_at	BMP7	206508_at	CD70	218787_x_at	CWF19L1
220155_s_at	BRD9	204440_at	CD83	204533_at	CXCL10
203754_s_at	BRF1	210895_s_at	CD86	205583_s_at	CXorf45
218954_s_at	BRF2	202892_at	CDC23	205584_at	CXorf45
222374_at	BTRC	213613_s_at	CDC2L2	207843_x_at	CYB5A
212121at	C10orf61	215169_at	CDC2L2	207063_at	CYorf14
220539_at	C10orf92	208727_s_at	CDC42	211295_x_at	CYP2A6
218213_s_at	C11orf10	203794_at	CDC42BPA	206661_at	DBF4B
218789_s_at	C11orf71	214721_x_at	CDC42EP4	216646_at	DCC1
217462_at	C11orf9	218157_x_at	CDC42SE1	212919_at	DCP2
218108_at	C14orf130	206327_s_at	CDH15	205311_at	DDC
213508_at	C14orf147	206328_at	CDH15	214788_x_at	DDN
218183_at	C16orf5	213182_x_at	CDKN1C	221293_s_at	DEF6
217508_s_at	C18orf25	216894_x_at	CDKN1C	207356_at	DEFB4
203197_s_at	C1orf123	207646_s_at	CDY1	203385_at	DGKA
217087_at	C1orf68	212501_at	CEBPB	213632_at	DHODH
218081_at	C20orf27	217262_s_at	CELSR1	220690_s_at	DHRS7B
221762_s_at	C20orf67	212677_s_at	CEP68	218579_s_at	DHX35
219617_at	C2orf34	208007_at	CES3	213514_s_at	DIAPH1
212936_at	C5orf21	212539_at	CHD1L	215541_s_at	DIAPH1
218518_at	C5orf5	216900_s_at	CHRNA4	214724_at	DIXDC1
204238_s_at	C6orf108	206533_at	CHRNA5	221595_at	DIZ1
211350_s_at	C6orf54	214863_at	CHST7	212327_at	DIZ1
208809_s_at	C6orf62	218267_at	CINP	212729_at	DLG3
47083_at	C7orf26	205516_x_at	CIZ1	213707_s_at	DLX5
207839_s_at	C9orf127	219890_at	CLEC5A	215266_at	DNAH3
219223_at	C9orf7	209874_x_at	CNNM2	215252_at	DNAJC7
203963_at	CA12	208243_s_at	CNR1	215116_s_at	DNM1
210735_s_at	CA12	219400_at	CNTNAP1	213160_at	DOCK2
204865_at	CA3	203654_s_at	COIL	55583_at	DOCK6
210770_s_at	CACNA1A	211343_s_at	COL13A1	215237_at	DOCK9
202715_at	CAD	211809_x_at	COL13A1	202810_at	DRG1
207243_s_at	CALM2	211473_s_at	COL4A6	207258_at	DSCR4
215161_at	CAMK1G	213428_s_at	COL6A1	57532_at	DVL2
				213162_at	DYNC1LI2

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
201999_s_at	DYNLT1	205384_at	FXYD1	219719_at	HIGD1B
209365_s_at	ECM1	209415_at	FZR1	208826_x_at	HINT1
210984_x_at	EGFR	203146_s_at	GABBR1	209911_x_at	HIST1H2BD
202326_at	EHMT2	209304_x_at	GADD45B	202934_at	HK2
208725_at	EIF2S2	212889_x_at	GADD45IP1	218152_at	HMG20A
205321_at	EIF2S3	217445_s_at	GART	206074_s_at	HMGA1
211937_at	EIF4B	210872_x_at	GAS7	210457_x_at	HMGA1
214445_at	ELL2	217011_at	GBX1	209675_s_at	HNRPUL1
203442_x_at	EML3	202182_at	GCN5L2	205462_s_at	HPCAL1
212969_x_at	EML3	202721_s_at	GFPT1	212552_at	HPCAL1
205757_at	ENTPD5	205721_at	GFRA2	211549_s_at	HPGD
212375_at	EP400	218719_s_at	GINS3	216760_at	HRASLS2
217245_at	EPAG	45633_at	GINS3	207066_at	HRC
204505_s_at	EPB49	218317_x_at	GIYD2	214767_s_at	HSPB6
203499_at	EPHA2	206920_s_at	GLE1L	205133_s_at	HSPE1
210651_s_at	EPHB2	209276_s_at	GLRX	201655_s_at	HSPG2
203720_s_at	ERCC1	217807_s_at	GLTSCR2	211152_s_at	HTRA2
202441_at	ERLIN1	209727_at	GM2A	214333_x_at	IDH3G
214608_s_at	EYA1	218913_s_at	GMIP	213821_s_at	IDS
205620_at	F10	210604_at	GNAT2	205058_at	IDUA
204231_s_at	FAAH	204630_s_at	GOSR1	220744_s_at	IFT122
207547_s_at	FAM107A	213206_at	GOSR2	215121_x_at	IGL@
213166_x_at	FAM128A	207926_at	GP5	218234_at	ING4
57715_at	FAM26B	201618_x_at	GPAA1	48825_at	ING4
205775_at	FAM50B	218895_at	GPATCH3	201598_s_at	INPPL1
216897_s_at	FAM76A	209220_at	GPC3	202809_s_at	INTS3
203805_s_at	FANCA	204984_at	GPC4	203906_at	IQSEC1
215530_at	FANCA	220265_at	GPR107	202531_at	IRF1
205189_s_at	FANCC	64942_at	GPR153	220225_at	IRX4
220255_at	FANCE	206582_s_at	GPR56	209663_s_at	ITGA7
212218_s_at	FASN	204793_at	GPRASP1	216331_at	ITGA7
208153_s_at	FAT2	209350_s_at	GPS2	216190_x_at	ITGB1
201275_at	FDPS	204265_s_at	GPSM3	211323_s_at	ITPR1
204819_at	FGD1	206709_x_at	GPT	219213_at	JAM2
214571_at	FGF3	221364_at	GRID2	216309_x_at	JRK
208225_at	FGFR2	214611_at	GRIK1	204678_s_at	KCNK1
201540_at	FHL1	205915_x_at	GRIN1	45653_at	KCTD13
40850_at	FKBP8	210400_at	GRIN2C	203934_at	KDR
212024_x_at	FLII	212090_at	GRINA	206478_at	KIAA0125
219525_at	FLJ10847	208365_s_at	GRK4	212735_at	KIAA0226
217288_at	FLJ13236	215030_at	GRSF1	201776_s_at	KIAA0494
207758_at	FLJ23185	218154_at	GSDMDC1	212814_at	KIAA0828
208749_x_at	FLOT1	200696_s_at	GSN	215943_at	KIAA1661
1773_at	FNTB	201415_at	GSS	220340_at	KIAA1772
204764_at	FNTB	215333_x_at	GSTM1	220002_at	KIF26B
206371_at	FOLR3	202451_at	GTF2H1	212699_at	KLF4
204420_at	FOSL1	211940_x_at	H3F3A	213573_at	KPNB1
213260_at	FOXC1	216174_at	HCRP1	213574_s_at	KPNB1
207658_s_at	FOXG1A	216326_s_at	HDAC3	218303_x_at	KRCC1
216572_at	FOXL1	217937_s_at	HDAC7A	212858_at	KREMEN2
215221_at	FOXP1	208461_at	HIC1	207908_at	KRT2

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
217325_at	KRT3	208795_s_at	MCM7	213670_x_at	NSUN5B
201820_at	KRT5	218163_at	MCTS1	214100_x_at	NSUN5B
213769_at	KSR1	216071_x_at	MED12	213842_x_at	NSUN5C
207509_s_at	LAIR2	213126_at	MED8	201173_x_at	NUDC
216264_s_at	LAMB2	202645_s_at	MEN1	213461_at	NUDT21
207930_at	LCN1	212673_at	METAP1	210793_s_at	NUP98
203236_s_at	LGALS9	203406_at	MFAP1	221991_at	NXPH3
219699_at	LGI2	214588_s_at	MFAP3	216690_at	OR7A5
211219_s_at	LHX2	221192_x_at	MFSD11	201799_s_at	OSBP
219541_at	LIME1	210484_s_at	MGC31957	216755_at	OSBPL10
206718_at	LMO1	213710_s_at	MGP	219073_s_at	OSBPL10
209204_at	LMO4	218251_at	MID1IP1	204024_at	OSGIN2
211562_s_at	LMOD1	215916_at	MINK1	207200_at	OTC
213776_at	LOC157562	215292_s_at	MKL1	214546_s_at	P2RY11
216386_at	LOC220077	211826_s_at	MLL	207543_s_at	P4HA1
214239_x_at	LOC284106	213708_s_at	MLX	212778_at	PACS2
212578_x_at	LOC402057	217910_x_at	MLX	208875_s_at	PAK2
214110_s_at	LOC654342	205330_at	MN1	203154_s_at	PAK4
214101_s_at	LOC728896	217982_s_at	MORF4L1	33814_at	PAK4
215196_at	LOC91316	218853_s_at	MOSPD1	202336_s_at	PAM
210102_at	LOH11CR2A	219967_at	MRM1	221941_at	PAOX
218509_at	LPPR2	218982_s_at	MRPS17	222282_at	PAPD4
221956_at	LRCH4	218654_s_at	MRPS33	220315_at	PARP11
214873_at	LRP5L	217533_x_at	MST101	219034_at	PARP16
218550_s_at	LRRC20	202247_s_at	MTA1	221969_at	PAX5
211747_s_at	LSM5	210212_x_at	MTCP1	221990_at	PAX8
210629_x_at	LST1	217070_at	MTHFR	202465_at	PCOLCE
219922_s_at	LTBP3	211507_s_at	MTMR3	219043_s_at	PDCL3
204442_x_at	LTBP4	210360_s_at	MTSS1	206691_s_at	PDIA2
213176_s_at	LTBP4	204056_s_at	MVK	32029_at	PDPK1
218729_at	LXN	210088_x_at	MYL4	217923_at	PEF1
206584_at	LY96	221659_s_at	MYLC2PL	49878_at	PEX16
210044_s_at	LYL1	204139_x_at	MZF1	211033_s_at	PEX7
202625_at	LYN	201621_at	NBL1	205361_s_at	PFDN4
200901_s_at	M6PR	211685_s_at	NCALD	217383_at	PGK1
217102_at	MAG	221955_at	NCLN	207384_at	PGLYRP1
220062_s_at	MAGEC2	204888_s_at	NEURL	208491_s_at	PGM5
218969_at	Magmas	207416_s_at	NFATC3	202928_s_at	PHF1
210093_s_at	MAGOH	205897_at	NFATC4	40446_at	PHF1
209166_s_at	MAN2B1	209973_at	NFKBIL1	205450_at	PHKA1
220945_x_at	MANSC1	214497_s_at	NHLH2	212881_at	PIAS4
202424_at	MAP2K2	202007_at	NID1	207105_s_at	PIK3R2
213490_s_at	MAP2K2	222038_s_at	NME1	211580_s_at	PIK3R3
210482_x_at	MAP2K5	221073_s_at	NOD1	201081_s_at	PIP5K2B
203901_at	MAP3K7IP1	214123_s_at	NOL14	202522_at	PITPNB
214219_x_at	MAP4K1	210098_s_at	NOL7	219155_at	PITPNC1
206040_s_at	MAPK11	214321_at	NOV	210451_at	PKLR
213178_s_at	MAPK8IP3	205459_s_at	NPAS2	209872_s_at	PKP3
201460_at	MAPKAPK2	218822_s_at	NPEPL1	220423_at	PLA2G2D
35147_at	MCF2L	204648_at	NPR1	221389_at	PLA2G2E
214056_at	MCL1	210730_s_at	NPY2R	210647_x_at	PLA2G6

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
219014_at	PLAC8	214999_s_at	RAB11FIP3	208458_at	SCNN1D
202924_s_at	PLAGL2	213531_s_at	RAB3GAP1	202084_s_at	SEC14L1
210388_at	PLCB2	201047_x_at	RAB6A	216346_at	SEC14L3
205112_at	PLCE1	213970_at	RABL3	209207_s_at	SEC22B
219011_at	PLEKHA4	220338_at	RALGPS2	204344_s_at	SEC23A
215668_s_at	PLXNB1	204916_at	RAMP1	203528_at	SEMA4D
206942_s_at	PMCH	219214_s_at	RBAK	208100_x_at	SEMA6C
215412_x_at	PMS2L2	208984_x_at	RBM10	208999_at	SEPT8
216525_x_at	PMS2L3	217221_x_at	RBM10	207425_s_at	SEPT9
218961_s_at	PNKP	213852_at	RBM8A	209722_s_at	SERPINE9
217343_at	PNLIPRP2	209219_at	RDBP	200631_s_at	SET
203422_at	POLD1	210106_at	RDH5	201357_s_at	SF3A1
201115_at	POLD2	218599_at	REC8L1	209381_x_at	SF3A2
212836_at	POLD3	204280_at	RGS14	202037_s_at	SFRP1
208828_at	POLE3	209070_s_at	RGS5	201129_at	SFRS7
217635_s_at	POLG	222131_x_at	RHOT2	205367_at	SH2B2
218997_at	POLR1E	65770_at	RHOT2	209090_s_at	SH3GLB1
202725_at	POLR2A	220282_at	RIC3	213464_at	SHC2
214144_at	POLR2D	35685_at	RING1	206558_at	SIM2
202634_at	POLR2K	221063_x_at	RNF123	200718_s_at	SKP1A
217769_s_at	POMP	222058_at	RNF130	211112_at	SLC12A4
206345_s_at	PON1	216179_x_at	RNF24	207254_at	SLC15A1
53720_at	PPAN	201529_s_at	RPA1	204229_at	SLC17A7
208044_s_at	PPARD	216589_at	RPL10	206396_at	SLC1A1
215280_s_at	PPFIA3	200036_s_at	RPL10A	204981_at	SLC22A18
206064_s_at	PPIL2	214143_x_at	RPL24	210010_s_at	SLC25A1
202187_s_at	PPP2R5A	212044_s_at	RPL27A	212085_at	SLC25A6
203529_at	PPP6C	211073_x_at	RPL3	201250_s_at	SLC2A1
209826_at	PPT2	219762_s_at	RPL36	202497_x_at	SLC2A3
201494_at	PRCP	202028_s_at	RPL38	216236_s_at	SLC2A3
211743_s_at	PRG2	221943_x_at	RPL38	222088_s_at	SLC2A3
212559_at	PRKAR1B	208856_x_at	RPLP0	218494_s_at	SLC2A4RG
200707_at	PRKCSH	200908_s_at	RPLP2	217530_at	SLC34A1
214080_x_at	PRKCSH	203436_at	RPP30	218928_s_at	SLC37A1
212905_at	PRKG1	216348_at	RPS17	217778_at	SLC39A1
202251_at	PRPF3	203379_at	RPS6KA1	210692_s_at	SLC43A3
209161_at	PRPF4	204906_at	RPS6KA2	210353_s_at	SLC6A2
208879_x_at	PRPF6	212912_at	RPS6KA2	212292_at	SLC7A1
218714_at	PRR14	213903_s_at	RQCD1	215401_at	SLC7A1
45687_at	PRR14	216649_at	RREB1	219911_s_at	SLCO4A1
205869_at	PRSS1	219037_at	RRP15	212258_s_at	SMARCA2
209586_s_at	PRUNE	36129_at	RUTBC1	214360_at	SMARCA4
200866_s_at	PSAP	217946_s_at	SAE1	209516_at	SMYD5
201676_x_at	PSMA1	201543_s_at	SAR1A	219409_at	SNIP1
211746_x_at	PSMA1	211322_s_at	SARDH	213121_at	SNRP70
201316_at	PSMA2	200069_at	SART3	215450_at	SNRPE
205956_x_at	PSMC3IP	213435_at	SATB2	205644_s_at	SNRPG
208776_at	PSMD11	215064_at	SC5DL	202358_s_at	SNX19
208522_s_at	PTCH1	219416_at	SCARA3	213827_at	SNX26
203030_s_at	PTPRN2	201826_s_at	SCCPDH	209253_at	SORBS3
218732_at	PTRH2	219808_at	SCLY	203509_at	SORL1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
205406_s_at	SPA17	215455_at	TIMELESS	208997_s_at	UCP2
200053_at	SPAG7	212665_at	TIPARP	215125_s_at	UGT1A1
208045_at	SPAR	212701_at	TLN2	206094_x_at	UGT1A6
218164_at	SPATA20	221060_s_at	TLR4	221323_at	ULBP1
213441_x_at	SPDEF	208716_s_at	TMCO1	220998_s_at	UNC93B1
214404_x_at	SPDEF	200087_s_at	TMED2	214624_at	UPK1A
207841_at	SPIN2A	218615_s_at	TMEM39A	210064_s_at	UPK1B
202523_s_at	SPOCK2	219410_at	TMEM45A	207862_at	UPK2
214926_at	SPTAN1	212282_at	TMEM97	222032_s_at	USP7
201247_at	SREBF2	215855_s_at	TMF1	201557_at	VAMP2
218140_x_at	SRPRB	211689_s_at	TMPRSS2	205536_at	VAV2
219204_s_at	SRR	214009_at	TMSB4X	219810_at	VCPIP1
207435_s_at	SRRM2	202510_s_at	TNFAIP2	208844_at	VDAC3
202591_s_at	SSBP1	216325_x_at	TNFRSF6B	202172_at	VEZF1
219241_x_at	SSH3	213201_s_at	TNNT1	214585_s_at	VPS52
51192_at	SSH3	210585_s_at	TNPO2	212533_at	WEE1
200652_at	SSR2	216845_x_at	TNRC21	203892_at	WFDC2
208482_at	SSTR1	212883_at	TOMM40	221113_s_at	WNT16
215362_at	ST8SIA2	202080_s_at	TRAK1	218015_s_at	WRNIP1
208065_at	ST8SIA3	211788_s_at	TREX2	221147_x_at	WWOX
205743_at	STAC	203148_s_at	TRIM14	214567_s_at	XCL2
208992_s_at	STAT3	210885_s_at	TRIM15	220020_at	XPNPEP3
218424_s_at	STEAP3	215047_at	TRIM58	208459_s_at	XPO7
217903_at	STRN4	219272_at	TRIM62	200638_s_at	YWHAZ
212111_at	STX12	204649_at	TROAP	200641_s_at	YWHAZ
203615_x_at	SULT1A1	216489_at	TRPM3	208199_s_at	ZFP161
212894_at	SUPV3L1	221102_s_at	TRPM6	201369_s_at	ZFP36L2
203069_at	SV2A	215735_s_at	TSC2	207246_at	ZFY
206719_at	SYNGR4	210953_at	TSC22D2	212124_at	ZMIZ1
210537_s_at	TADA2L	215547_at	TSC22D2	54970_at	ZMIZ2
213787_s_at	TBC1D25	215106_at	TTC22	207559_s_at	ZMYM3
205424_at	TBKBP1	218838_s_at	TTC31	204523_at	ZNF140
200711_s_at	TCEB1P	46167_at	TTC4	216677_at	ZNF154
215260_s_at	TCF3	217429_at	TTLL2	206261_at	ZNF239
205255_x_at	TCF7	210129_s_at	TTLL3	213778_x_at	ZNF276
204849_at	TCFL5	216609_at	TXN	220250_at	ZNF286A
203743_s_at	TDG	201580_s_at	TXNDC13	218707_at	ZNF444
212494_at	TENC1	202779_s_at	UBE2S	215124_at	ZNF550
221871_s_at	TFG	215558_at	UBR2	213658_at	ZNF710
209561_at	THBS3	212106_at	UBXD8	214138_at	ZNF79
				207933_at	ZP2

Tab. VIII: regulierte Gene nach ELK3 siRNA vermittelte Inhibition in HA1ER, P-Wert < 0,05

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
202804_at	ABCC1	203864_s_at	ACTN2	214423_x_at	ALDOB
214504_at	ABO	208223_s_at	ACVR1B	205621_at	ALKBH1
204617_s_at	ACD	216705_s_at	ADA	207381_at	ALOX12B
201715_s_at	ACIN1	221337_s_at	ADAM29	213099_at	ANGEL1
210337_s_at	ACLY	217380_s_at	ADD3	202920_at	ANK2
207969_x_at	ACRV1	215483_at	AKAP9	218274_s_at	ANKZF1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
214875_x_at	APLP2	209007_s_at	C1orf63	205350_at	CRABP1
210873_x_at	APOBEC3A	219570_at	C20orf23	212180_at	CRKL
206632_s_at	APOBEC3B	219617_at	C2orf34	219913_s_at	CRNKL1
214995_s_at	APOBEC3F	221959_at	C8orf72	202646_s_at	CSDE1
209546_s_at	APOL1	210735_s_at	CA12	207951_at	CSN2
202629_at	APPBP2	219928_s_at	CABYR	212073_at	CSNK2A1
207956_x_at	APRIN	34726_at	CACNB3	205344_at	CSPG5
205239_at	AREG	201382_at	CACYBP	207925_at	CST5
208750_s_at	ARF1	209031_at	CADM1	218924_s_at	CTBS
212738_at	ARHGAP19	217196_s_at	CAMSAP1L1	214731_at	CTTNBP2NL
209435_s_at	ARHGEF2	212948_at	CAMTA2	215147_at	CUGBP2
202641_at	ARL3	214888_at	CAPN2	204470_at	CXCL1
211575_s_at	ARPC2	204950_at	CARD8	206336_at	CXCL6
213387_at	ATAD2B	218384_at	CARHSP1	205583_s_at	CXorf45
220223_at	ATAD5	212971_at	CARS	205584_at	CXorf45
206684_s_at	ATF7	218153_at	CARS2	207843_x_at	CYB5A
208758_at	ATIC	205467_at	CASP10	203475_at	CYP19A1
206993_at	ATP5S	209701_at	CAST	211295_x_at	CYP2A6
201444_s_at	ATP6AP2	58994_at	CC2D1A	211231_x_at	CYP4A11
212062_at	ATP9A	221822_at	CCDC101	218808_at	DALRD3
211852_s_at	ATRN	210133_at	CCL11	212595_s_at	DAZAP2
203231_s_at	ATXN1	210072_at	CCL19	218094_s_at	DBNDD2
216391_s_at	ATXN8OS	35150_at	CD40	209783_at	DBP
208080_at	AURKA	211075_s_at	CD47	205371_s_at	DBT
211631_x_at	B4GALT1	201925_s_at	CD55	211896_s_at	DCN
208478_s_at	BAX	204440_at	CD83	217973_at	DCXR
209958_s_at	BBS9	205533_s_at	CDH6	209383_at	DDIT3
219798_s_at	BCDIN3	218740_s_at	CDK5RAP3	210206_s_at	DDX11
210347_s_at	BCL11A	207073_at	CDKL2	208151_x_at	DDX17
201169_s_at	BHLHB2	211156_at	CDKN2A	208895_s_at	DDX18
213709_at	BHLHB9	216751_at	CDRT4	219945_at	DDX25
210334_x_at	BIRC5	204539_s_at	CELSR1	203784_s_at	DDX28
220451_s_at	BIRC7	36499_at	CELSR2	220890_s_at	DDX47
203773_x_at	BLVRA	218950_at	CENTD3	214787_at	DENND4A
206044_s_at	BRAF	208007_at	CES3	218858_at	DEPDC6
208686_s_at	BRD2	209194_at	CETN2	215003_at	DGCR7
218954_s_at	BRF2	214486_x_at	CFLAR	209190_s_at	DIAPH1
218955_at	BRF2	212539_at	CHD1L	221595_at	DIAPH1
214116_at	BTD	205516_x_at	CIZ1	212328_at	DIAPH1
201236_s_at	BTG2	219640_at	CLDN15	212729_at	DLG3
200777_s_at	BZW1	221698_s_at	CLEC7A	215210_s_at	DLSTP
209183_s_at	C10orf10	201560_at	CLIC4	214304_x_at	DMN
215072_x_at	C10orf137	204375_at	CLSTN3	216827_at	DNAJB6
212419_at	C10orf56	211343_s_at	COL13A1	204008_at	DNAL4
218299_at	C11orf24	211964_at	COL4A2	218457_s_at	DNMT3A
221231_s_at	C14orf102	212091_s_at	COL6A1	220668_s_at	DNMT3B
213246_at	C14orf130	212937_s_at	COL6A1	220139_at	DNMT3L
213508_at	C14orf147	212938_at	COL6A1	211121_s_at	DOK1
219526_at	C14orf169	213428_s_at	COL6A1	202632_at	DPH1
219005_at	C19orf4	209029_at	COPS7A	219512_at	DSN1
212005_at	C1orf144	212228_s_at	COQ9	216918_s_at	DST

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
207042_at	E2F2	202838_at	FUCA1	216301_at	IGL@
204038_s_at	EDG2	209414_at	FZR1	206172_at	IL13RA2
201842_s_at	EFEMP1	202275_at	G6PD	205926_at	IL27RA
210132_at	EFNA3	209990_s_at	GABBR2	212196_at	IL6ST
212227_x_at	EIF1	204417_at	GALC	210029_at	INDO
202461_at	EIF2B2	203179_at	GALT	201598_s_at	INPPL1
209429_x_at	EIF2B4	216400_at	GBA	222239_s_at	INTS6
200865_at	EIF3S5	203765_at	GCA	200992_at	IPO7
201303_at	EIF4A3	211020_at	GCNT2	219843_at	IPP
214313_s_at	EIF5B	200008_s_at	GDI2	213392_at	IQCK
212670_at	ELN	216316_x_at	GK7P	203275_at	IRF2
210724_at	EMR3	203157_s_at	GLS	214392_at	IRGC
201341_at	ENC1	221869_at	GM632	216190_x_at	ITGB1
208156_x_at	EPPK1	214679_x_at	GNA11	214021_x_at	ITGB5
218778_x_at	EPS8L1	40562_at	GNA11	201188_s_at	ITPR3
220012_at	ERO1LB	206917_at	GNA13	214599_at	IVL
202942_at	ETFB	210424_s_at	GOLGA8A	219213_at	JAM2
215136_s_at	EXOSC8	204630_s_at	GOSR1	216309_x_at	JRK
202915_s_at	FAM20B	208813_at	GOT1	210434_x_at	JTB
202916_s_at	FAM20B	204984_at	GPC4	211045_s_at	KCNH6
203262_s_at	FAM50A	215225_s_at	GPR17	221889_at	KCTD13
219438_at	FAM77C	218855_at	GPR175	45653_at	KCTD13
220353_at	FAM86C	221385_s_at	GPR42	217894_at	KCTD3
32209_at	FAM89B	203632_s_at	GPRC5B	212380_at	KIAA0082
205189_s_at	FANCC	204265_s_at	GPSM3	205496_at	KIAA0408
216602_s_at	FARSA	206709_x_at	GPT	212814_at	KIAA0828
203184_at	FBN2	202045_s_at	GRLF1	215186_at	KIAA0984
208989_s_at	FBXL11	200678_x_at	GRN	209680_s_at	KIFC1
216395_at	FBXL18	202451_at	GTF2H1	216676_x_at	KIR3DL3
216950_s_at	FCGR1A	211940_x_at	H3F3A	209211_at	KLF5
208647_at	FDFT1	217156_at	HADHA	219931_s_at	KLHL12
201275_at	FDPS	207052_at	HAVCR1	210307_s_at	KLHL25
207813_s_at	FDXR	200896_x_at	HDGF	204385_at	KYNU
221086_s_at	FEZF2	219719_at	HIGD1B	202019_s_at	LANCL1
219249_s_at	FKBP10	38340_at	HIP1R	218922_s_at	LASS4
200709_at	FKBP1A	214502_at	HIST1H2BJ	214471_x_at	LHB
212169_at	FKBP9	221582_at	HIST3H2A	212658_at	LHFPL2
210786_s_at	FLI1	202934_at	HK2	205876_at	LIFR
217288_at	FLJ13236	218152_at	HMG20A	217892_s_at	LIMA1
219141_s_at	FLJ20294	202772_at	HMGCL	219760_at	LIN7B
65635_at	FLJ21865	221750_at	HMGCS1	215123_at	LOC440345
207758_at	FLJ23185	220633_s_at	HP1BP3	213142_x_at	LOC54103
208614_s_at	FLNB	209513_s_at	HSDL2	208107_s_at	LOC81691
201350_at	FLOT2	202415_s_at	HSPBP1	216666_at	LOC93432
222033_s_at	FLT1	219998_at	HSPC159	204692_at	LRCH4
203689_s_at	FMR1	221084_at	HTR3B	222017_x_at	LRCH4
1773_at	FNTB	213038_at	IBRDC3	214873_at	LRP5L
206371_at	FOLR3	204785_x_at	IFNAR2	205282_at	LRP8
202580_x_at	FOXN1	201642_at	IFNGR2	211971_s_at	LRPPRC
210773_s_at	FPRL1	202146_at	IFRD1	219886_at	LRRIQ2
219907_at	FRS3	216517_at	IGKV1D-8	206408_at	LRRTM2

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
202625_at	LYN	207380_x_at	NOX1	214144_at	POLR2D
200901_s_at	M6PR	205459_s_at	NPAS2	202634_at	POLR2K
210302_s_at	MAB21L2	221210_s_at	NPL	205218_at	POLR3F
208634_s_at	MACF1	221348_at	NPPC	212178_s_at	POM121
202360_at	MAML1	209505_at	NR2F1	208928_at	POR
201461_s_at	MAPKAPK2	202340_x_at	NR4A1	216330_s_at	POU6F1
214270_s_at	MAPRE3	206879_s_at	NRG2	212226_s_at	PPAP2B
215445_x_at	MARCH1	212182_at	NUDT4	212230_at	PPAP2B
219574_at	MARCH1	209629_s_at	NXT2	210236_at	PPFIA1
208210_at	MAS1	201282_at	OGDH	215280_s_at	PPFIA3
207824_s_at	MAZ	221375_at	OR1G1	203735_x_at	PPFIBP1
209072_at	MBP	216690_at	OR7A5	218273_s_at	PPM2C
207115_x_at	MBTD1	219073_s_at	OSBPL10	201407_s_at	PPP1CB
214057_at	MCL1	214546_s_at	P2RY11	209490_s_at	PPT2
219592_at	MCPH1	222273_at	PAPOLG	214527_s_at	PQBP1
219348_at	MDS032	209431_s_at	PATZ1	220453_at	PQLC2
210153_s_at	ME2	221969_at	PAX5	201494_at	PRCP
216071_x_at	MED12	217738_at	PBEF1	220571_at	PRDM11
213710_s_at	MGP	217739_s_at	PBEF1	220928_s_at	PRDM16
201285_at	MKRN1	213263_s_at	PCBP2	214917_at	PRKAA1
212076_at	MLL	205663_at	PCBP3	207505_at	PRKG2
201299_s_at	MOBK1B	209996_x_at	PCM1	208880_s_at	PRPF6
219852_s_at	MORN1	211170_s_at	PDE10A	210915_x_at	PRSS1
218865_at	MOSC1	215575_at	PDE4DIP	200866_s_at	PSAP
205079_s_at	MPDZ	220343_at	PDE7B	208776_at	PSMD11
206764_x_at	MPPE1	204879_at	PDPN	201762_s_at	PSME2
215919_s_at	MRPS11	221898_at	PDPN	209852_x_at	PSME3
218982_s_at	MRPS17	204545_at	PEX6	218956_s_at	PTCD1
212913_at	MSH5	320_at	PEX6	206482_at	PTK6
211887_x_at	MSR1	211033_s_at	PEX7	203997_at	PTPN3
202247_s_at	MTA1	205361_s_at	PFDN4	217793_at	RAB11B
203036_s_at	MTSS1	215832_x_at	PICALM	219412_at	RAB38
203037_s_at	MTSS1	205281_s_at	PIGA	201047_x_at	RAB6A
207633_s_at	MUSK	209019_s_at	PINK1	220500_s_at	RABL2A
207915_at	MYCL2	211205_x_at	PIP5K1A	213970_at	RABL3
218926_at	MYNN	201133_s_at	PJA2	205037_at	RABL4
205610_at	MYOM1	202328_s_at	PKD1	200607_s_at	RAD21
212406_s_at	MYT1	212628_at	PKN2	210255_at	RAD51L1
208754_s_at	NAP1L1	221854_at	PKP1	204558_at	RAD54L
212967_x_at	NAP1L1	220423_at	PLA2G2D	204828_at	RAD9A
201774_s_at	NCAPD2	221389_at	PLA2G2E	219125_s_at	RAG1AP1
215859_at	NCLN	210647_x_at	PLA2G6	53987_at	RANBP10
204888_s_at	NEURL	205125_at	PLCD1	211952_at	RANBP5
209290_s_at	NFIB	205934_at	PLCL1	219112_at	RAPGEF6
209973_at	NFKBIL1	201136_at	PLP2	212706_at	RASA4
201708_s_at	NIPSNAP1	215668_s_at	PLXNB1	212332_at	RBL2
219680_at	NLRX1	206471_s_at	PLXNC1	217221_x_at	RBM10
202115_s_at	NOC2L	213241_at	PLXNC1	218134_s_at	RBM22
200874_s_at	NOL5A	202337_at	PMF1	209936_at	RBM5
222080_s_at	NOL7	216175_at	POLD2	222049_s_at	RBP4
218754_at	NOL9	216026_s_at	POLE	218117_at	RBX1

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
205331_s_at	REEP2	205716_at	SLC25A40	216183_at	TGM2
205815_at	REG3A	216790_at	SLC28A1	219122_s_at	THG1L
218124_at	RETSAT	220181_x_at	SLC30A5	212207_at	THRAP2
202963_at	RFX5	217778_at	SLC39A1	221938_x_at	THRAP5
214538_x_at	RGS6	212292_at	SLC7A1	215171_s_at	TIMM17A
204402_at	RHBDD3	214536_at	SLURP1	219058_x_at	TINAGL1
200059_s_at	RHOA	201074_at	SMARCC1	204227_s_at	TK2
212099_at	RHOB	212147_at	SMG5	202606_s_at	TLK1
222131_x_at	RHOT2	202507_s_at	SNAP25	215843_s_at	TLL2
214700_x_at	RIF1	204466_s_at	SNCA	217974_at	TM7SF3
221215_s_at	RIPK4	204467_s_at	SNCA	218745_x_at	TMEM161A
206845_s_at	RNF40	213121_at	SNRP70	212202_s_at	TMEM87A
204208_at	RNGTT	205644_s_at	SNRPG	215855_s_at	TMF1
207939_x_at	RNPS1	202358_s_at	SNX19	206769_at	TMSB4Y
205578_at	ROR2	215223_s_at	SOD2	202510_s_at	TNFAIP2
214143_x_at	RPL24	204432_at	SOX12	204933_s_at	TNFRSF11B
200018_at	RPS13	219888_at	SPAG4	216845_x_at	TNRC21
216360_x_at	RRP12	204434_at	SPATA2	221496_s_at	TOB2
216913_s_at	RRP12	220192_x_at	SPDEF	204080_at	TOE1
213750_at	RSL1D1	219257_s_at	SPHK1	200662_s_at	TOMM20
206949_s_at	RUSC1	207841_at	SPIN2A	201812_s_at	TOMM7
218370_s_at	S100PBP	218990_s_at	SPRR3	212409_s_at	TOR1AIP1
220793_at	SAGE1	46256_at	SPSB3	217914_at	TPCN1
213435_at	SATB2	208611_s_at	SPTAN1	214195_at	TPP1
215064_at	SC5DL	215235_at	SPTAN1	210177_at	TRIM15
201826_s_at	SCCPDH	208800_at	SRP72	210885_s_at	TRIM15
210918_at	SCRG1	217991_x_at	SSBP3	202342_s_at	TRIM2
222021_x_at	SDHALP1	204963_at	SSPN	216527_at	TRIM26
209175_at	SEC23IP	204964_s_at	SSPN	210463_x_at	TRMT1
221931_s_at	SEH1L	208065_at	ST8SIA3	210438_x_at	TROVE2
219259_at	SEMA4A	221610_s_at	STAP2	202642_s_at	TRRAP
208100_x_at	SEMA6C	200028_s_at	STARD7	213968_at	TSPAN5
207425_s_at	SEPT9	205170_at	STAT2	215106_at	TTC22
205075_at	SERPINF2	205339_at	STIL	203894_at	TUBG2
201070_x_at	SF3B1	208854_s_at	STK24	210803_at	TXNRD2
215004_s_at	SF4	215416_s_at	STOML2	221906_at	TXNRD3
208673_s_at	SFRS3	203330_s_at	STX5	205546_s_at	TYK2
201129_at	SFRS7	221727_at	SUB1	218347_at	TYW1
37004_at	SFTPB	214835_s_at	SUCLG2	218340_s_at	UBE1L2
214492_at	SGCD	201483_s_at	SUPT4H1	213291_s_at	UBE3A
201396_s_at	SGTA	209362_at	SURB7	212108_at	UBXD8
209322_s_at	SH2B1	215860_at	SYT12	215154_at	ULK2
209090_s_at	SH3GLB1	211382_s_at	TACC2	214843_s_at	USP33
222302_at	SHC3	203977_at	TAZ	219675_s_at	UXS1
209899_s_at	SIAHBP1	213787_s_at	TBC1D25	207101_at	VAMP1
220047_at	SIRT4	201815_s_at	TBC1D5	202549_at	VAPB
204928_s_at	SLC10A3	219771_at	TBC1D8B	203868_s_at	VCAM1
210047_at	SLC11A2	205424_at	TBKBP1	213692_s_at	VDR
210040_at	SLC12A5	209528_s_at	TELO2	203106_s_at	VPS41
201920_at	SLC20A1	206649_s_at	TFE3	218022_at	VRK3
211842_s_at	SLC24A1	209676_at	TFPI	217659_at	WAPAL

ID	Symbol	ID	Symbol	ID	Symbol
38964_r_at	WAS	214567_s_at	XCL2	220250_at	ZNF286A
212606_at	WDFY3	208459_s_at	XPO7	200868_s_at	ZNF313
203855_at	WDR47	213999_at	YIPF4	219228_at	ZNF331
215218_s_at	WDR62	210996_s_at	YWHAE	218707_at	ZNF444
221712_s_at	WDR74	216531_at	YY2	220617_s_at	ZNF532
212533_at	WEE1	203602_s_at	ZBTB17	213389_at	ZNF592
215276_at	WFDC8	212704_at	ZCCHC11	213658_at	ZNF710
210861_s_at	WISP3	37586_at	ZNF142	214813_at	ZNF75
				219050_s_at	ZNHIT2

Tab. IX: GO-Analyse („Biological process“) der Transkriptionsfaktoren der Schnittmengen von SRF, FRA1, ELK3 in HA1EB und HA1ER

	IDs	Symbol	Angereicherte GO-Annotation
A HA1EB 15/105 IDs	219382_at	SERTAD3	Cellular Metabolism (15/15)
	206613_s_at	TAF1A	Development (5/15)
	208740_at	SAP18	Posttranslational Protein Modification (3/15)
	205883_at	ZBTB16	
	219568_x_at	SOX18	
	202818_s_at	TCEB3	
	222123_s_at	HIF3A	
	214532_x_at	POU5F1P1	
	209088_s_at	UBN1	
	201510_at	ELF3	
	209151_x_at	TCF3	
	219904_at	ZSCAN5	
	213579_s_at	EP300	
	216315_x_at	UBE2V1	
	221094_s_at	ELP3	
B HA1ER 10/48 IDs	218152_at	HMG20A	Cellular Metabolism (10/10)
	202451_at	GTF2H1	
	202247_s_at	MTA1	
	210885_s_at	TRIM15	
	208133_at	RFC1	
	213435_at	SATB2	
	216071_x_at	MED12	
	218707_at	ZNF444	
	218954_s_at	BRF2	
	205459_s_at	NPAS2	

15/105 IDs bzw. 10/48 IDs bezieht sich auf die Anzahl von Transkriptionsfaktoren innerhalb der Gesamtschnittmenge

Tab. X: GO-Analyse („Biological Process“) der Transkriptionsfaktoren der Schnittmengen der Expressionsprofile SRF- und FRA1-siRNA-behandelter Zellen

		IDs	Symbol	GO Biological Process
A	<i>SRF</i> 11/230 IDs	213806_at	PURA	regulation metabolic processes (11/11)
		217242_at	ZNF154	developmental processes (5/11)
		202247_s_at	MTA1	
		201710_at	MYBL2	
		208196_x_at	NFATC1	
		206419_at	RORC	
		213722_at	SOX2	
		214404_x_at	SPDEF	
		204474_at	ZNF142	
		201248_s_at	SREBF2	
		206558_at	SIM2	
B	<i>FRA1</i> 5/105 IDs	202247_s_at	MTA1	GO Biological Process
		221990_at	PAX8	cellular metabolic process (5/5)
		204139_x_at	MZF1	
		214404_x_at	SPDEF	
		217910_x_at	MLX	

11/230 IDs bzw. 5/105 IDs bezieht sich auf die Anzahl von Transkriptionsfaktoren innerhalb der Gesamtschnittmenge

Tab. XI: GO analyse der Transkriptionsfaktoren, die von SRF, FRA1 und ELK3 in HA1ER angesteuert werden

siRNA gegen	regulierte Transkriptionsfaktoren	GO Klassifizierung
A SRF 120/1953 IDs, 104 Gene	ADNP2, BLZF1, C11ORF9, CREB3L2, CREBBP, CUX1, ELK4, EMX2, ERG, ESR1, ESRRG, ETV1, ETV2, FOS, FOXC1, FOXE3, FOXO3, FOXP1, HLF, HMG20A, HMGA1, HOXA3, HOXC5, HOXD1, HOXD13, IRX4, JARID1A, KLF5, LEF1, LHX1, LHX6, LZTR1, MLL4, MLLT10, MSX2, MYNN, NFIB, NFX1, NKX2-x, NPAS2, NR0B1, NR0B2, NR1H2, NR2E3, NR3C2, NR4A1, PGR, PKNOX1, PKNOX2, POU4F1, POU6F1, RARB, RB1, RERE, RUNX1, RUNX1T1, RXRB, SATB2, SMAD1, SMARCA4, SNAPC2, SOX4, SPDEF, SREBF2, SRF, STAT3, SUPT4H1, TADA3L, TAF13, TBX19, TCFL5, TLX2, TNRC4, TSC22D2, USF2, ZFH3, ZHX3, ZIC1, ZNF134, ZNF135, ZNF175, ZNF215, ZNF287, ZNF323, ZNF35, ZNF75, ZNF80, ZSCAN16	Cellular metabolic process (85/104), Chromatin modification (9/104), Immuno response (3/104), Apoptosis (3/104), Development (3/104), Differentiation (3/104)
B FRA1 72/708 IDs, 50 Gene	AEBP1, AFF1, ATF5, BATF, BRF1, C11ORF9, CEBPB, CUX1, DLX5, FOSL1, FOXC1, FOXG1, FOXL1, FOXP1, GAS7, HIC1, HMG20A, HMGA1, IRF1, IRX4, LHX2, LMO1, LMO4, MLX, MSL3L1, NA, NFATC3, NFATC4, NPAS2, PCGF2, PHF1, PLAGL2, PPARD, SATB2, SIM2, SLC2A4RG, SMARCA4, SPDEF, SREBF2, STAT3, TADA2L, TCF3, TCFL5, TRIM15, TSC22D2, ZFP36L2, ZNF140, ZNF154, ZNF434, ZNF444	Cellular metabolic process (46/50), Chromatin modification (5/50), anti-Apoptosis (3/50), Inflammatory (4/50)
C ELK3 37/677 IDs, 35 Gene	ATF7, BHLHB2, BTG2, DBP, DDIT3, E2F2, FLI1, FOXM1, HMG20A, IRF2, KLF5, LASS4, MLL, MTA1, MYCL2, MYNN, MYT1, NFIB, NPAS2, NR2F1, NR4A1, POU6F1, PRDM16, RFX5, SATB2, SPDEF, STAT2, SUPT4H1, TFE3, TRIM15, VDR, ZBTB17, ZNF142, ZNF444, ZNF75	Cellular metabolic process (36/37), Apoptosis (3/37), Response DNA Damage stimu (3/37), Cell cycle (3/37)

120/1953 IDs, 72/708 IDs, 37/677 IDs bezieht sich auf die Anzahl von Transkriptionsfaktoren innerhalb der Gesamtmenge, 104, 72 und 35 Gene beziehen sich auf die Anzahl der von den IDs repräsentierten Gene

Tab. XII: SRF-siRNA-abhängig regulierte Gene mit höchster Anreicherung der TRAP-Affinitäten für SRF

	ID	Symbol	P-Wert	SCR	MOCK	SRF1	SRF2
A <i>HA1EB</i> <i>aufreguliert</i>	205681_at	BCL2A1	2,33E-02	11,091	3,836	4,503	4,914
	38241_at	BTN3A3	1,50E-02	0,639	0,397	5,664	3,183
	204820_s_at	BTN3A3	4,05E-02	1,28	0,658	2,713	1,79
	204821_at	BTN3A3	1,63E-02	0,72	0,421	5,043	2,406
	204490_s_at	CD44	2,85E-02	6,254	2,506	3,34	4,719
	209835_x_at	CD44	3,46E-02	5,825	2,561	3,838	4,638
	212014_x_at	CD44	6,20E-03	5,882	3,554	3,215	4,141
	201438_at	COL6A3	4,47E-03	4,853	2,988	3,288	5,285
	212838_at	DNMBP	1,31E-02	3,962	1,028	5,892	5,167
	221563_at	DUSP10	4,61E-02	1,978	0,832	5,717	4,194
	215501_s_at	DUSP10	2,65E-02	1,889	1,225	3,136	2,286
	221911_at	ETV1	8,06E-03	3,956	2,635	3,38	3,467
	204774_at	EVI2A	3,91E-02	1,127	0,265	5,182	2,485
	206662_at	GLRX	3,89E-02	3,992	1,351	3,459	4,004
	215071_s_at	HIST1H2AC	4,11E-02	0,849	0,392	6,671	2,614
	205067_at	IL1B	4,12E-02	71,998	24,619	6,247	14,663
	216250_s_at	LPXN	1,11E-02	4,079	1,122	4,202	7,144
	212909_at	LYPD1	2,00E-02	4,585	2,341	5,855	5,782
	215707_s_at	PRNP	7,82E-03	8,519	2,618	5,742	8,71
	204337_at	RGS4	9,17E-03	0,797	0,128	14,392	4,829
	204338_s_at	RGS4	5,00E-03	1	0,263	8,866	4,723
	204339_s_at	RGS4	2,04E-02	1,161	0,446	4,605	2,404
	212724_at	RND3	2,24E-02	1,193	0,472	5,176	2,28
	204614_at	SERPINB2	1,61E-02	8,411	0,115	47,608	34,292
	201920_at	SLC20A1	1,99E-02	4,661	1,546	4,005	3,922
	207777_s_at	SP140	1,40E-02	0,895	0,273	4,688	2,226
	204597_x_at	STC1	3,38E-02	7,234	2,146	4,174	6,742
	209277_at	TFPI2	1,13E-03	23,571	5,678	41,738	40,306
	219569_s_at	TMEM22	3,73E-02	2,443	0,685	6,194	3,46
	206467_x_at	TNFRSF6B	3,89E-02	6,484	3,045	7,468	3,409
B <i>HA1EB</i> <i>abreguliert</i>	217838_s_at	EVL	3,88E-02	0,192	0,495	0,203	0,54
	203638_s_at	FGFR2	3,55E-02	0,357	0,523	0,35	0,547
	204135_at	FILIP1L	6,60E-03	0,147	0,647	0,11	0,225
	201654_s_at	HSPG2	4,17E-02	0,276	1,1	0,486	0,305
	202822_at	LPP	6,16E-04	0,894	1,958	0,221	0,259
	202245_at	LSS	2,55E-02	0,895	0,878	0,461	0,467
	201058_s_at	MYL9	7,75E-03	0,484	1,204	0,169	0,116
	219630_at	PDZK1IP1	7,39E-03	0,024	0,171	0,13	0,064
	208607_s_at	SAA2	7,86E-03	0,05	0,691	0,151	0,085
	214456_x_at	SAA2	6,54E-03	0,043	0,546	0,127	0,077
	205547_s_at	TAGLN	5,45E-03	0,447	0,882	0,068	0,036
C <i>HA1ER</i> <i>aufreguliert</i>	201012_at	ANXA1	3,62E-03	0,622	0,279	2,743	4,41
	205263_at	BCL10	2,24E-02	1,492	0,401	2,959	1,592
	218285_s_at	BDH2	1,24E-02	0,77	0,467	2,748	1,682
	204821_at	BTN3A3	4,89E-02	0,72	0,421	5,224	1,965
	38241_at	BTN3A3	2,65E-02	0,639	0,397	8,152	2,53
	218374_s_at	C12orf4	4,21E-02	0,916	1,26	2,012	3,089
	218518_at	C5orf5	1,12E-02	0,452	0,441	3,864	5,404

	ID	Symbol	P-Wert	SCR	MOCK	SRF1	SRF2
	200880_at	DNAJA1	2,22E-02	0,77	0,319	3,784	1,857
	203810_at	DNAJB4	3,33E-02	0,447	0,756	1,879	3,147
	203811_s_at	DNAJB4	2,37E-02	0,754	1,085	1,824	3,419
	202451_at	GTF2H1	1,92E-02	1,308	0,66	2,437	2,954
	205133_s_at	HSPE1	9,97E-03	0,987	0,771	1,828	2,757
	203851_at	IGFBP6	1,79E-02	0,553	0,147	4,581	2,145
	205664_at	KIN	5,04E-03	0,867	1,299	3,728	2,226
	203203_s_at	KRR1	3,45E-02	0,571	0,467	5,909	2,809
	202016_at	MEST	2,07E-02	0,778	0,522	3,023	5,096
	201316_at	PSMA2	1,83E-03	0,689	0,589	2,793	4,172
	204219_s_at	PSMC1	1,48E-02	1,223	0,583	1,735	2,802
	201699_at	PSMC6	1,69E-03	1,148	0,464	2,01	2,554
	204337_at	RGS4	4,76E-02	0,797	0,128	3,701	4,236
	218140_x_at	SRPRB	2,48E-02	1,143	1,017	1,539	2,894
	218050_at	UFM1	5,71E-03	0,777	0,53	2,972	1,933
D HA1ER <i>abreguliert</i>	205047_s_at	ASNS	2,53E-02	1,376	0,798	0,469	0,384
	216000_at	ASNS	8,62E-03	0,754	1,063	1,316	1,321
	213041_s_at	ATP5D	1,11E-02	0,843	0,931	0,375	0,381
	208978_at	CRIP2	1,36E-02	1,373	1,921	0,485	0,301
	201790_s_at	DHCR7	3,20E-02	0,981	2,303	0,359	0,514
	201791_s_at	DHCR7	4,40E-02	1,176	2,296	0,341	0,399
	212218_s_at	FASN	2,23E-03	0,656	1,044	0,305	0,426
	201275_at	FDPS	2,57E-03	2,038	1,641	0,408	0,404
	211019_s_at	LSS	4,13E-03	0,927	1,441	0,449	0,313
	202247_s_at	MTA1	3,04E-02	0,713	1,267	0,685	0,391
	211783_s_at	MTA1	1,85E-02	0,883	0,975	0,451	0,182
	212694_s_at	PCCB	1,36E-02	1,788	1,361	0,506	0,249
	213093_at	PRKCA	3,97E-02	1,022	1,824	0,174	0,497
	213988_s_at	SAT1	4,18E-02	2,433	2,764	0,615	0,21
	202037_s_at	SFRP1	3,62E-02	1,575	0,796	0,396	0,07
	209218_at	SQLE	4,76E-02	1,261	2,163	0,433	0,517
	213562_s_at	SQLE	4,34E-02	2,12	3,351	0,224	0,368
	201042_at	TGM2	4,21E-02	5,068	1,655	0,567	0,203
	217914_at	TPCN1	1,26E-02	1,516	2,01	0,311	0,261

Tab. III: ELK3-siRNA-abhängig regulierte Gene mit höchster Anreicherung der TRAP-Affinitäten für ELK3

	ID	Symbol	P-Wert	SCR	MOCK	ELK3
A HA1EB <i>aufreguliert</i>	218331_s_at	C10orf18	2,25E-02	33,986	0,993	2,075
	202213_s_at	CUL4B	4,25E-02	0,597	1,482	0,695
	206504_at	CYP24A1	8,96E-03	1,172	1,115	1,275
	210762_s_at	DLC1	1,17E-02	3,312	3,513	0,353
	203810_at	DNAJB4	4,91E-02	0,06	1,35	0,525
	203811_s_at	DNAJB4	3,55E-02	8,048	0,661	1,282
	208965_s_at	IFI16	4,07E-02	1,654	0,966	1,31
	204439_at	IFI44L	3,49E-02	8,44	4,982	2,369
	205018_s_at	MBNL2	4,92E-02	0,145	1,238	0,735
	204994_at	MX2	4,32E-02	0,929	0,956	2,282
	204972_at	OAS2	3,57E-02	3,953	1,005	0,644
	204005_s_at	PAWR	3,46E-02	1,575	0,936	0,878
	202430_s_at	PLSCR1	4,82E-02	0,837	1,311	0,58

	ID	Symbol	P-Wert	SCR	MOCK	ELK3
	219178_at	QTRTD1	3,78E-02	1,025	0,902	0,919
	201711_x_at	RANBP2	3,68E-02	11,551	0,797	1,784
	219691_at	SAMD9	5,00E-02	0,073	0,126	9,24
	200924_s_at	SLC3A2	4,60E-02	9,067	0,12	11,854
	209921_at	SLC7A11	3,85E-02	4,568	1,207	1,264
	203743_s_at	TDG	5,00E-02	0,075	0,215	3,697
	201108_s_at	THBS1	1,56E-02	31,966	1,026	0,844
	201109_s_at	THBS1	1,53E-02	5,332	1,562	1,652
	201110_s_at	THBS1	2,43E-02	3,559	0,927	0,86
	210705_s_at	TRIM5	2,90E-02	0,287	1,104	0,601
B <i>HA1EB</i> <i>abreguliert</i>	204966_at	BAI2	4,31E-02	0,361	1,018	1,317
	204907_s_at	BCL3	1,19E-02	1,044	0,931	2,275
	204908_s_at	BCL3	1,42E-02	1,291	1,754	0,47
	217767_at	C3	4,82E-02	0,611	1,317	1,353
	213428_s_at	COL6A1	4,15E-02	23,598	0,919	1,584
	208978_at	CRIP2	3,39E-02	0,165	1,307	0,592
	210229_s_at	CSF2	2,77E-02	26,349	0,818	0,924
	218537_at	HCFC1R1	4,66E-02	116,915	0,76	1,236
	45714_at	HCFC1R1	1,40E-02	5,191	1,197	0,822
	212347_x_at	MXD4	1,99E-02	2,217	0,872	0,721
	209159_s_at	NDRG4	2,48E-02	0,028	0,912	0,917
	209079_x_at	PCDHGA1	1,57E-02	9,071	0,394	5,558
	215836_s_at	PCDHGC3	1,78E-02	49,467	1,054	0,889
	212593_s_at	PDCD4	4,84E-02	0,319	1,292	1,861
	219630_at	PDZK1IP1	3,15E-02	1,01	1,379	1,175
	204044_at	QPRT	1,24E-02	19,241	1,178	3,305
	208607_s_at	SAA2	2,16E-02	0,401	0,869	0,778
	214456_x_at	SAA2	4,68E-02	1,522	0,923	0,848
	202898_at	SDC3	3,17E-02	0,525	0,967	2,432
	218494_s_at	SLC2A4RG	2,96E-02	46,697	0,72	0,72
	204955_at	SRPX	1,65E-02	59,159	2,168	3,353
	203381_s_at	TOMM40	4,13E-02	0,023	0,256	0,104
C <i>HA1ER</i> <i>aufreguliert</i>	200777_s_at	BZW1	1,44E-02	1,135	1,203	2,676
	213246_at	C14orf130	4,84E-02	1,221	0,399	4,403
	208895_s_at	DDX18	1,19E-03	1,045	0,935	2,071
	215136_s_at	EXOSC8	2,83E-02	0,988	0,457	2,149
	202451_at	GTF2H1	1,47E-02	1,308	0,66	3,311
	202934_at	HK2	2,31E-02	1,853	0,829	3,723
	202146_at	IFRD1	3,32E-02	0,766	1,093	12,375
	212196_at	IL6ST	3,22E-02	1,184	3,829	2,984
	211971_s_at	LRPPRC	3,90E-02	0,829	0,897	2,778
	218926_at	MYNN	1,08E-02	1,036	1,165	2,109
	219073_s_at	OSBPL10	2,75E-02	1,03	0,511	2,01
	209431_s_at	PATZ1	3,41E-02	0,889	0,745	2,161
	205361_s_at	PFDN4	4,90E-02	1,265	4,285	3,352
	212099_at	RHOB	1,87E-02	0,326	0,232	2,703
	213750_at	RSL1D1	4,49E-02	1,338	0,574	2,035
	221931_s_at	SEH1L	3,65E-02	0,912	0,857	2,193
	208673_s_at	SFRS3	3,31E-02	0,463	0,451	3,218

	ID	Symbol	P-Wert	SCR	MOCK	ELK3
	212147_at	SMG5	3,54E-02	1,901	2,197	2,044
	208800_at	SRP72	1,10E-02	0,72	0,816	3,148
	209362_at	SURB7	4,65E-02	1,093	1,445	2,765
	211382_s_at	TACC2	5,34E-03	2,112	2,232	2,379
	215171_s_at	TIMM17A	2,03E-02	0,465	0,442	2,377
	202606_s_at	TLK1	4,20E-02	0,499	2,081	3,359
	212202_s_at	TMEM87A	3,76E-02	0,931	0,679	4,346
	210463_x_at	TRMT1	2,79E-02	0,887	0,714	2,019
	221712_s_at	WDR74	2,60E-02	1,26	0,784	2,149
	210996_s_at	YWHAE	4,54E-02	1,433	1,098	1,91
D HA1ER <i>abreguliert</i>	206632_s_at	APOBEC3B	2,87E-02	1,238	0,221	0,449
	208478_s_at	BAX	2,58E-02	1,04	1,166	0,364
	210735_s_at	CA12	4,46E-02	4,867	3,158	0,347
	218384_at	CARHSP1	2,60E-03	1,735	2,027	0,342
	211343_s_at	COL13A1	2,56E-03	2,377	2,123	0,446
	212091_s_at	COL6A1	2,74E-02	1,979	2,005	0,208
	212937_s_at	COL6A1	2,26E-02	1,323	2,89	0,334
	212938_at	COL6A1	4,39E-02	1,477	3,273	0,314
	213428_s_at	COL6A1	1,34E-02	2,215	2,721	0,167
	218924_s_at	CTBS	9,94E-03	3,129	1,964	0,362
	206336_at	CXCL6	3,54E-03	0,071	0,212	0,091
	212328_at	DKFZP684O1247	2,22E-02	6,343	8,681	0,476
	219249_s_at	FKBP10	3,39E-02	0,441	0,766	0,367
	204417_at	GALC	6,03E-04	0,709	1,039	0,196
	201642_at	IFNGR2	1,30E-02	2,23	2,393	0,509
	206172_at	IL13RA2	1,02E-03	2,42	1,639	0,514
	217894_at	KCTD3	2,53E-02	1,529	1,229	0,247
	213142_x_at	LOC54103	3,96E-02	1,157	0,699	0,346
	205282_at	LRP8	2,99E-02	1,246	1,219	0,493
	203036_s_at	MTSS1	4,96E-02	1,116	1,213	0,717
	203037_s_at	MTSS1	1,90E-02	4,778	2,459	0,233
	212406_s_at	MYT1	4,90E-02	1,341	1,413	0,498
	205459_s_at	NPAS2	4,51E-02	2,884	6,608	0,463
	204879_at	PDPN	2,16E-02	3,282	4,361	0,274
	221898_at	PDPN	2,15E-02	3,034	3,15	0,241
	212332_at	RBL2	4,33E-02	2,435	2,91	0,47
	204466_s_at	SNCA	2,01E-02	3,492	2,483	0,427
	204467_s_at	SNCA	2,53E-03	1,83	1,265	0,589
	215223_s_at	SOD2	9,68E-03	1,856	2,177	0,08
	219771_at	TBC1D8B	2,65E-02	0,972	1,645	0,507
	202510_s_at	TNFAIP2	3,40E-02	0,234	0,411	0,452
	204933_s_at	TNFRSF11B	1,39E-03	1,507	1,752	0,439
	219675_s_at	UXS1	2,57E-02	2,041	1,201	0,427
	203868_s_at	VCAM1	1,69E-02	1,681	8,45	0,106

Tab. XIV: Ras ERK-abhängig regulierte ATF3-Zielgene in HA1ER

AFFYID	SYMBOL	P-Wert			Expressionsänderung		
		ER vs EB	ER U0126	ER vs EB	ER U048	ER U096	U0 96h vs 48h
202076_at	BIRC2	4,57E-15	0,661	0,667	1,364	1,206	0,884
204794_at	DUSP2	3,59E-19	0,426	0,688	1,567	1,447	0,923
204994_at	MX2	7,28E-15	0,000	0,048	2,939	1,077	0,366
202620_s_at	PLOD2	4,57E-15	0,981	0,935	1,567	1,577	1,006
202619_s_at	PLOD2	1,63E-14	0,991	0,986	1,939	1,577	0,814
209544_at	RIPK2	2,48E-15	0,493	1,307	0,745	0,788	1,057
209545_s_at	RIPK2	2,48E-15	0,895	1,151	0,637	0,677	1,063
202687_s_at	TNFSF10	2,48E-15	0,000	0,063	1,908	0,999	0,524
214329_x_at	TNFSF10	1,63E-14	0,000	0,078	1,704	1,057	0,620
202688_at	TNFSF10	2,48E-15	0,001	0,054	2,958	0,670	0,227
203476_at	TPBG	2,48E-15	0,708	1,346	0,748	0,610	0,815

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei den Menschen, die mich in den letzten Jahren durch die Arbeit an diesem Projekt sowohl im Labor, als auch außerhalb begleitet haben. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle erwähnen:

Frau Dr. Christine Sers, bei der ich die Möglichkeit hatte, im Rahmen des SFB618 ein so interessantes Projekt für meine Dissertation zu bearbeiten. Des Weiteren möchte ich mich bei ihr für die Unterstützung bei der Durchführung, die anregenden Diskussionen und hilfreichen Ratschläge bis in den Korrekturprozess hinein bedanken.

Den Kollegen der Arbeitsgruppen Schäfer und Sers: Technischen Assistenten, Praktikanten, Doktoranden die mich mit Rat und Tat unterstützt haben und die mir zum Teil gute Freunde geworden sind. Es war mir eine Freude, mit Euch zusammenzuarbeiten.

Ewa Szczurek, Szymon Kielbasa und Christine Steinhoff vom Max Planck Institut für molekulare Genetik, die mir mit ihrem Fachwissen weiterhalfen und einen wichtigen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Raphaela Günther für offene Ohren, angeregte unkonventionelle Gespräche in und außerhalb des Labors sowie Kaffee, wenn man ihn braucht.

Meiner Familie und meinen Freunden, dafür dass sie da sind, die sie sind.

Publikationsliste

Veröffentlichungen

R Abdul-Ghani, V Serra, B Györfy, K Jürchott, **A Solf**, M Dietel and R Schäfer. The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1. **Oncogene** (2006) **25**, 1743–1752

Nils Blüthgen, Stefan Legewie, Szymon M. Kielbasa, Anja Schramme, Oleg Tchernitsa, Jana Keil, **Andrea Solf**, Martin Vingron, Reinhold Schäfer, Hanspeter Herzel and Christine Sers. A systems biological approach suggests that transcriptional feedback regulation by dual-specificity phosphatase 6 shapes extracellular signal-related kinase activity in RAS-transformed fibroblasts. **FEBS Journal** (2009) **276**, 1024–1035

Posterpräsentationen

Transcriptional Networks in RAS oncogene-driven MEK/ERK signaling. **Andrea Solf**, Ute Ungethüm, Christine Steinhoff, Martin Vingron, Cornelia Gieseler, Lena Herbst, Christine Sers (**Signal Transduction Society Meeting**, Weimar 2007)

A role for FRA1 in the control of transcriptional network reorganization following RAS transformation. Stephanie Seibt, **Andrea Solf**, Christine Steinhoff, Szymon Kielbasa, Ewa Szczurek, Martin Vingron, Christine Sers (**Signal Transduction Society Meeting**, Weimar 2008)

RAS oncogene induced MEK/ERK mediated transcription networks in Human Embryonic Kidney (HEK) cells. **Andrea Solf**, Christine Steinhoff, Ewa Szczurek, Szymon Kielbasa, Martin Vingron, Cornelia Gieseler, Ute Ungethüm, Christine Sers (**XX International Congress of Genetics**, Berlin 2008)

FRA1: New insights into the transcriptional network reorganization following RAS transformation. **Andrea Solf**, Stephanie Seibt, Christine Steinhoff, Szymon M. Kielbasa, Ewa Szczurek, Martin Vingron, Christine Sers (**15th AEK Cancer Congress**, Berlin 2009)

Berlin, den

Selbständigkeitserklärung

Ich, Andrea Solf, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Transkriptionelle Netzwerke der RAS-abhängigen, MEK-ERK-vermittelten Transformation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den
